植物生理学实验



科学出版社



植物生理学实验

F.H. 魏海姆 D.F. 鲍勒德斯 R.M. 戴威林著

中国科学院植物研究所生理生化研究室译



科 学 出 版 社

1 9 7 4



内 容 简 介

本书包括56个实验，内容涉及细胞生理、水分生理、矿质营养、呼吸代谢、光合作用等植物生理学的各个领域，其中生长发育和植物激素方面的实验较多；既是基础理论，也有近年来的研究成果，实验方法上采用了较新的技术．

可供高等院校生物系、农学系师生和有关科技人员参考．

F. H. Witham　D. F. Blaydes　R. M. Devlin
EXPERIMENTS IN PLANT PHYSIOLOGY
Van Nostrand Reinhold Company
1971

植物生理学实验

F.H. 魏海姆　D.F. 鲍勒德斯　R.M. 戴威林著
中国科学院植物研究所生理生化研究室译

*

科学出版社出版
北京朝阳門内大街137号
中国科学院印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行　各地新华书店经售

*

1974年1月第一版　开本：787×1092　1/32
1974年1月第一次印刷　印张：9 1/16
印数：0001—11,500　字数：205,000

统一书号：13031·135
本社书号：252·13—10
定价：0.94 元

前　言

这本手册中的实验是为了一至两学期的植物生理学课程用的．它们在内容和复杂性上是很不同的，这样就能对于个别选择、课程设计以及可利用的设备提供最大的适应性．此外，其中有些实验可以用于高级植物生理学课程，它们在正式的教学中没有提到．

鉴于实验的数目很多，不能期望在任何一个课程中完成所有的实验，但是他们应该有区别地选择提供范围很广的基本的生理学概念和技术．

虽然我们想按照题目的共性把实验分组，这在某些情况下是行不通的，在这本手册中的实验是按顺序编排的．在一个课程中所选择的实验是很不相同的，所以要由每一教师自由决定．附录对于帮助安排和指导制备特别试剂具有相当的价值．

每一实验包括着目的、材料、步骤、结果和结论，还有文献．这样编排除了在每一练习中解决技术以外，还间接地说明了科学交流的基本论理和方式．材料的数量和性质是对一组学生进行全部实验用的．照我们的经验，在上课前制备材料和试剂是方便些．但是某些制备技术对于化学基础差的学生可能是有用的．

每一实验的步骤部分包括着不同的项目，在完整性上这可能是不够完全的，这要看练习本身和期望包括的范围．

关于得到的结果，书中有表格可以记录事实资料．过去我们鼓励学生在一个短的报告上写出他们的结果和结论，因

为这样对增进基本概念和技术是有效的.

文献部分可以提高学生关于特别的创造性的努力的理解，练习就是以此为基础. 文献目录不是太广泛，但是提供了知识背景，并可作为得到更大范围的文献的起点.

F H. 魏海姆 (Witham)

D. F. 鲍勒德斯 (Blaydes)

R. M. 戴威林(Devlin)

目　录

实验 1　植物营养和矿质缺乏

目的

为了证明植物生长在不同的营养液里表现出的矿质缺乏症状.

材料

40 株菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)幼苗(7—10 天苗龄);
13 种水溶贮备液,在玻璃瓶中(表 1-1);
13 个容量瓶(1 升,为制备贮备液用);
13 支移液管(5 毫升);
几个大的三角瓶和烧杯;
11 个 1/4 加仑的缸(或陶器罐);
11 个塑料口袋;
11 个有 4 个孔的木盖;
30 个软木塞(先在每个塞上打一个孔并纵切成相等 的两半);
一套打孔器;
刀片;
外科用小刀;
标记用铅笔;
棉花;
温室;
尺.

步骤

A. 植物材料

可用各种植物来证明矿质缺乏症．但一般用番茄、向日葵、菸草或菜豆植物，因为它们能很好地表现出不同的症状．为了得到所要求生长阶段的幼苗（7—10天苗龄的幼苗），在用蒸馏水稀释成1:6的商品次氯酸溶液中浸种20分钟消毒种子．若种子有浮起的趋向，可盖上用溶液饱和的棉花．

消毒后，将种子放在盆或皿里的湿润的蛭石上，并再用半英吋的蛭石覆盖．该种子在室温下或温室里很容易发芽．仅用蒸馏水来维持发芽的幼苗．

B. 贮备液

贮备液的制备是取一定量的每种化学药品（表1-1）放在一个容量瓶里并加入蒸馏水到容积（1升）．每个容器仅用来装一种化学药品．如所需贮备液少于一升，则按比例地减少化学药品量．

C. 容器和盖子

不同式样的容器例如冰淇凌盒、陶器罐或瓦罐，用遮光铝箔、棕色纸或其他物质覆盖．不管用的是什么容器，使用前必须彻底刷洗干净或用塑料袋子衬里，有效地保证良好的实验结果．

正方形的盖子（用木板或石蜡浸过的纸板），预先打好四个分布均匀的孔．若没有准备盖子则可用热石蜡浸过的棕色包装纸和同样浸过的白色票据纸粘在一起做成，然后在每个盖子上打四个分布均匀的孔．

表 1-1 贮 备 液

化学药品	分子式	量(克/升)	克分子浓度(M)
A. 磷酸二氢铵	$NH_4H_2PO_4$	23	0.20
B. 硝酸铵	NH_4NO_3	40	0.50
C. 硝酸钙	$Ca(NO_3)_2$	189	1.15
D. 氯化钙	$CaCl_2$	29	0.26
E. 氯化镁	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	41	0.20
F. 硝酸镁	$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	51	0.20
G. 硫酸镁	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	99	0.40
H. 磷酸二氢钾	KH_2PO_4	27	0.20
I. 硝酸钾	KNO_3	121	1.20
J. 硫酸钾	K_2SO_4	87	0.50
K. 三氯化铁	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	10	0.04

L. 微量元素贮备液：

下述元素一起混合/1升蒸馏水　　克分子浓度($\times 10^{-2}$)

硼酸	H_3BO_3	0.72	1.200
氯化铜	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.02	0.012
氯化锰	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.45	0.230
氯化锌	$ZnCl_2$	0.06	0.044
钼酸(85%MoO_4)	$H_2MoO_4 \cdot H_2O$	0.01	0.006

M. Fe-EDTA(乙二胺四乙酸的铁络合物)：

溶解1340毫克乙二胺四乙酸二钠 ($Na_2C_{10}H_{14}O_8N_2 \cdot 2H_2O$)在500毫升蒸馏水中并加热．趁热加入990毫克 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 并强烈搅拌．

D. 营养液的配制

用洗涤剂洗涤11个1/4加仑的缸，并用自来水冲洗干净。每个缸的外边用铝箔围起来，使其肩和颈部完全遮盖．其次，每个缸用一个塑料袋子衬起来(如用罐，则用大号塑料袋)．

配制不同的营养液(每个学生或组所需的特殊的营养液由教师指定)，先在¼加仑缸中装满½蒸馏水，随后按表1-2

表 1-2 营 养 液

贮备液	具有缺乏病症的植物*									
	无	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe_1	Fe_2	微量元素
A.	5	—	—	5	5	—	—	5	5	5
B.	—	—	1	6	8	6	—	—	—	—
C.	5	—	5	5	—	5	5	5	5	5
D.	5	21	5	5	—	5	—	5	5	5
E.	—	—	—	—	—	—	5	—	—	—
F.	—	—	—	—	—	—	5	—	—	—
G.	5	5	5	5	5	—	—	5	5	5
H.	—	5	—	—	—	5	5	—	—	—
I.	5	—	5	—	5	1	5	5	5	5
J.	—	5	—	—	—	4	—	—	—	—
K.	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—
L.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	—
M.	2	2	2	2	2	2	2	—	—	2

* 指出的数目表示每升试验溶液所用的贮备溶液毫升量.

所示的加入贮备液(毫升). 表中所给的每一个贮备液的毫升数是为1升营养液所需要之量. 若所用的容器大于¼加仑，则将此溶液的体积按比例调整. 每种贮备液均应缓慢加入，并在下一个溶液加入之前充分混匀. 不要污染贮备液，否则得不到预期的结果.

加入贮备液后，用蒸馏水将缸子充满. 其余的空缸仅用蒸馏水加满，此作为对照(最后体积接近1升). 每个缸子充满水后立即盖好并写上标记.

E. 将幼苗移栽到营养液

在移栽幼苗之前，用蒸馏水充分浸泡蛭石，以便移动植物而尽可能少伤害根系. 根系用蒸馏水洗干净并将植物立即移

栽在营养液中.

每个缸子里移栽三株7—10天苗龄的菜豆幼苗. 盖子上每个孔放入一株植物,保留第四个孔作为灌水用. 用一小块松软的棉花缠绕茎部和切开的软木塞来支持幼苗的直立并使根系浸在液体里. 立即用蒸馏水充满缸子,用一根干净的玻璃棒搅拌每个溶液,并将缸子放在温室里的适当位置上.

最初几天,损伤或感染的幼苗应从发芽盘中更换一株新鲜的幼苗. 晚期死伤的不应再移植,但是要在实验报告中说明.

所培养的植物一个星期至少检查三次,每次按需要加入蒸馏水. 同时在溶液中通气. 当根系发育健康时溶液水平可下降一点.

表 1-3 矿质缺乏症状的观察

缺乏元素	3个星期观察	5个星期观察
不缺		
氮(N)		
磷(P)		
钾(K)		
钙(Ca)		
镁(Mg)		
硫(S)		
铁(Fe_1)		
铁(Fe_2)		

F. 幼苗生长和观察

每星期作观察,并对植物的状态进行记录. 记录生长3和5个星期后植物的表现(表1-3). 由于病症是与一个特定的缺乏相关的,一般在不同品种是不同的. 没有适合概括所有植株病症的正确的描述. 但是,菜豆植株生长在营养基中,

如缺乏磷、氮、钙、镁、钾、铁、硫(表 1-4) 其中一种元素即可以表现出最常看到的病症. 在你观察的基础上,记录与所表现病症最相当的缺乏元素.

表 1-4 缺乏病症的一般特征

症状	缺乏元素
1. 植物一般是淡绿色,虽然有些植物出现红的颜色;下部的叶子一般变黄,干瘪成淡褐色并落叶;茎短而细,生长矮小.	______
2. 植物通常是暗绿色,但是常常发展成红色和紫色;下部叶子有时为黄色,干瘪成绿褐色或黑色;早期落叶;植物矮小同时枝细叶子小.	______
3. 下部叶子有斑点或缺绿(最老的叶子有脉间缺绿);叶子有死斑,可能变红而且尖端和边缘卷曲或向上成碗状.	______
4. 最老的叶子(下部)有斑点或缺绿同时有死组织小斑点,常常是在尖端和叶脉中间;叶子的边缘变褐;茎秆细长同时叶子向前卷曲.	______
5. 尖端发黄而老叶仍保持绿色;生长矮小,上端死亡,幼枝生长异常并随即死亡;茎具凹点,茎心枯萎;有时根系粗短伴有黑点,根系看起来和触摸时发粘.	______
6. 幼叶子失绿,网状脉间失绿,随之初期生长的叶子发生褐变;主脉保有绿色;茎秆短而细. 7. 顶芽一般还活着;幼叶或叶芽蔫萎或缺绿,幼叶叶脉和叶脉间组织成淡绿色.	______ ______

实验总结时(约移植 5 个星期以后),收获每个缸中的植物,记录植株上部的长度、根系长度、上部的鲜重、根系鲜重、上部干重和根系干重. 假若需要,可将几株完整植物放在一边,备灰化和测定元素含量用(见实验 2).

植物的测量:

结果和结论

根据你观察的结果记录在表 1-3 中，并在实验结束时进行植物测量.

对结果的解释作为引导，写下在此实验中所列不同元素的已知的生理作用. 作一般的结论，可以使一个观察者能区别由缺乏矿质元素引起的病症不同于那些寄生物感染引起的病症. 利用水培方法作为研究植物矿质营养的优点是什么? 缺点是什么?

参考文献

Alexander, L. J., V. H. Morris, and H. C. Young. 1939. Growing plants in nutrient solution. Ohio Agri. Exp. Sta. Spec. Circ. 56.

Chapman, H. D. (Ed.) 1966. Diagnostic Criteria For Plants and Soils. Univ. of Calif., Div. of Agri. Sci., Berkeley, Calif.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp 287-309.

Dutt, J. O. and E. L. Bergman. 1966. Nutrient solution culture of plants. Penn. State Agri. Ext. Ser. Veg. Crops 2.

Epstein, E. 1965. Mineral metabolism. In: J. Bonner and J. E. Varner (Eds.) Plant Biochemistry. Academic Press, New York and London. pp. 438-466.

Gericke, W. F. 1942. The Complete Guide to Soilless Gardening. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

Hoagland, D. R. and D. I. Arnon. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Calif. Agri. Exp. Sta. Circ. 347.

Laurie, A. 1940. Soilless Culture Simplified. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.

Marlin, D. R. 1940 Growing Plants Without Soil, 2nd ed. Chem. Publ. Co., Inc., New York.

Philips, A. H. 1940. Gardening Without Soil. Chem. Publ. Co., Inc., New York.

Shive, J. W. and W. R. Robbins. 1938. Methods of growing plants in solutions and sand cultures. New Jersey Agri. Exp. Sta. Bull. 636.

Sprague, H. B. (Ed.) 1964. Hunger Signs in Crops, 3rd ed. David McKay Co., New York.

Stout, T. G. and M. E. Marvel. 1959. Hydroponic culture of vegetable crops. Florida Agri Ext. Ser. Circ. 92.

Wallace, T. 1961. The Diagnosis of Mineral Deficiencies In Plants, 3rd ed. Chem. Publ. Co., Inc., New York.

Withrow, R. B. and A. p. Withrow. 1948. Nutriculture. Purdue Univ. Agri. Exp. Sta. Spec. Circ. 328.

实验 2　植物灰分中的常量元素

目的

应用标准化学技术定性地测定植物灰分中的某些常量元素.

材料

50 克新鲜植物材料(种子、块茎组织、茎或叶子);

5%(重量/容量)下述溶液各 100 毫升(在滴瓶中): 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)、磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)、硫酸镁 ($MgSO_4$)、硫酸钾(K_2SO_4)、氯化钙($CaCl_2$)、硫氰化钾($KSCN$);

下面的溶液各 100 毫升(在滴瓶中):15%(容量/容量)过氯酸 ($HClO_4$)、10%(重量/容量) 二氯化钡 ($BaCl_2$)、50% (容量/容量)硫酸(H_2SO_4);

钼酸铵试剂(见书后附录);

镁试剂(见书后附录);

二苯胺浓硫酸试剂(见书后附录);

大坩锅(或铝箔杯);

干燥箱(定在 100 —105°C);

分析天平;

蒙烰炉(定在 550°C)

表面皿或滴试板;

显微镜;

显微镜载片和盖片.

步骤

A. 干灰化的方法

取约 50 克鲜植物材料（种子、块茎组织、茎或叶子）放入一个预先称好重量的容器(大坩锅或铝箔杯子). 材料放在一个定在 100—105°C的烘箱中干燥 24 小时或直至重量不变为止，然后称容器加样品重，再计算样品干重.

研磨干材料(清洁的研钵和杵或磨)并转移到一已知皮重的坩锅或瓷盘中. 记录重量后把灰分放入蒙烬炉中，并在 550°C灰化 2 小时或直至获得恒重. 灰化后冷却并称坩锅和内容物重，同时按下述大纲记录所有你测量的样品：

应用的植物部分和种类

鲜重和干重的测定	重量(克)
容器加样品	
容器	
样品鲜重	
容器加干燥样品	
容器	
样品干重	
鲜样品的干重百分数	
灰分的测定	
坩锅加干燥样品	
坩锅	
坩锅加灰分	
坩锅	
样品灰分重	
干重的灰分百分数	

鲜重的灰分百分数

B. 植物灰分中常量元素的检定

将灰分溶解在4毫升蒸馏水中(可以加极少量的盐酸)并应用此溶液进行如下实验:

磷:

放一滴5%的 KH_2PO_4 在清洁的显微镜载玻片上并在旁边加一滴钼酸铵试剂. 从盖片的边缘将其中的一滴引入另一滴,并等待几分钟. 应用显微镜观察并注意颜色和结晶的形状. 用一滴灰分溶液重复相同的步骤.

观察:

钾:

放一滴 K_2HPO_4 溶液(5%)在一个载片上并在其旁边加一滴15% $HClO_4$(小心!). 以下按测磷的方法,将两滴混合并观察 $KClO_4$ 结晶的形成. 在注意并记载它们的特有形状和颜色以后,在一滴灰分溶液上做相同的实验.

观察:

镁:

用上面同样的方式,试验一滴5% $MgSO_4$ 和一滴镁试剂并观察铵-镁-磷的结晶. 试验灰分溶液.

观察:

硫：

放一滴 5% K_2SO_4 和一滴 10% $BaCl_2$ 在一个显微镜载片上．混合后观察 $BaSO_4$ 的结晶，$BaSO_4$ 结晶表示硫的存在．用灰分溶液重复试验．

观察：

钙：

用一滴 50% H_2SO_4 试验一滴 5% $CaCl_2$．观察 $CaSO_4$ 结晶的形成．以相同的方法试验灰分溶液．

观察：

氮：

加 5 滴灰分溶液于一清洁的表面皿或滴试板中，加一滴 1%二苯胺-硫酸试剂并观察颜色的形成，这表明硝酸盐的存在．

观察：

铁：

加 5 滴灰分溶液和 3 滴 5% KSCN 于一清洁的滴试板上，有红色形成表示有铁的存在．

观察：

结果和结论

从灰分的分析构成一个表，列出所试的元素、植物材料和所用的测定．用颜色和(或)形成的沉淀或结晶，可以适当地表明一个肯定的或否定的试验．

你的结论应基于下述的考虑和问题：

灰化过程的结果，由于挥发造成某些元素的损失，损失了那些元素？实验中所采取的干灰化技术是否适用于磷和硫的定量测定？解释之．某种元素的大量存在，是否表明植物营养上的需要？种子中元素的高水平的重要性何在？这个实验中所采用的技术的局限性是什么？研究者必需注意什么地方？

参 考 文 献

Carolus, R. L. 1938. The use of rapid chemical plant nutrient tests in fertilizer deficiency diagnosis and vegetable crop research. Va. Truck Exp. Sta. Bull. 98.

Chapman, H. D. and p. F. pratt. 1961. Methods of analysis for soils, plants and waters. Univ. Calif. Div. of Agri Sci.

Cheng, K. L. and R. H. Bray. 1951. Determination of calcium and magnesium in soil and plant material. *Soil Sci.* 72: 449-458.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 287-309.

Fiske, C. H. and Y. Subbarow. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Biol. Chem.* **66**; 375-400.

Hillebrand, W. F., G. E. F. Lundell, H. A. Bright, and J. I. Hoffman. 1953. Applied Inorganic Analysis, 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Johnson, C. M. and A. Ulrich. 1959. Analytical methods for use

in plant analysis. Calif. Agri. Exp. Sta Bull. 766.

Piper, C. S. 1942. Soil and Plant Analysis; A laboratory manual of methods for the examination of soils and determination of the inorganic constituents of plants. Univ. of Adelaide.

Piper, C. S. 1944. Soil and Plant Analysis. Interscience Publ., Inc., New York.

Thornton, S. F., S. D. Conner, and R. R. Fraser. 1939. The use of rapid chemical tests on soils and plants as aids in determining fertilizer needs, Rev. ed. Ind. Agri. Exp. Sta. Circ. 204.

实验 3 由钴和镍离子引起的豆叶圆片的扩大

目的

表明叶子扩大试验和证明两元素对此生物效应的作用. 虽然在这里没有证明这个试验对研究叶子扩大作为植物光敏色素参与的反应,但也是理想的.

材料

25 株暗中生长的 7—9 天苗龄的菜豆苗 (*Phaseolus vulgaris* L. 'Burpee Dwarf Stringless Greenpod');

6 种试液:

基本介质(30 克 *d*-葡萄糖、8.09 克 KNO_3 用水溶解后并稀释到 1 升),

基本介质加 1×10^{-4}M $MnSO_4$ (30 克 *d*-葡萄糖、8.09 克 KNO_3 和 0.017 克 $MnSO_4\cdot H_2O$ 用水溶解后稀释到 1 升),

基本介质加 5×10^{-5}M $CoSO_4$(30 克 *d*-葡萄糖、8.09 克 KNO_3 和 0.014 克 $CoSO_4\cdot 7H_2O$ 用水溶解后并稀释到 1 升),

基本介质加 1×10^{-4}M $CoSO_4$ (30 克 *d*-葡萄糖, 8.09 克 KNO_3 和 0.028 克 $CoSO_4\cdot 7H_2O$ 用水溶解后并稀释到 1 升),

基本介质加 5×10^{-5}M $NiSO_4$(30 克 *d*-葡萄糖、8.09 克 KNO_3 和 0.014 克 $NiSO_4\cdot 7H_2O$ 用水溶解后并稀释到 1 升),

基本介质加 1×10^{-4}M $NiSO_4$(30 克 *d*-葡萄糖、8.09 克 KNO_3 和 0.028 克 $NiSO_4\cdot 7H_2O$ 用水溶解后并稀释到 1 升);

7 个培养皿(每个培养皿衬垫有 3 张滤纸)；

1 个打孔器(约 5.0 毫米直径)；

6 支移液管(10 毫升)；

具有绿色安全灯的暗室(见书后附录)；

米尺；

解剖镜.

步骤

A. 植物材料的准备

将菜豆种子(*Phaseolus vulgaris* L. 'Burpee Dwarf Stringless Greenpod')播于砂盘中,并放在约 25°C 的暗室里. 播种后砂盘用自来水饱和,以后每天加水一次. 该黄化的幼苗应在播种后 7—9 天后使用. 不要曝光.

B. 有试液的培养皿的准备

将每个培养皿标上号(1—7),在每个培养皿底加 3 张 9 厘米的滤纸.

然后加入 5 毫升下述试液到相应标记的培养皿中(加入足够的溶液使滤纸湿透,但勿使叶圆片浮起)：

1. 基本介质；
2. 基本介质；
3. 基本介质加 1×10^{-4}M $MnSO_4$;
4. 基本介质加 5×10^{-5}M $CoSO_4$;
5. 基本介质加 1×10^{-4}M $CoSO_4$;
6. 基本介质加 5×10^{-5}M $NiSO_4$;
7. 基本介质加 1×10^{-4}M $NiSO_4$.

C. 叶圆片的研究(从7—9天苗龄的黄化菜豆植株上取圆片)

为得到成功的结果,所有操作包括叶子圆片都只能在暗室中弱绿光下进行. 将每株植物子叶上部的两片单叶立即取下,并放在数层湿润纸上. 从每个单叶基部主脉两侧用打孔器钻取直径约5.0毫米的两个小圆片(两个小圆片/叶子). 用主侧脉部分作为每个圆片的近似直径(毫米).

切好后,转移每个圆片,使圆片的下表皮向上放在培养皿中衬垫的滤纸上(已用试液湿润过). 以同样方式将10个切下的圆片放在每个培养皿中.

如果所有处理均用同一个打孔器,则所有实验的圆片直径应没有明显的差异. 为进一步检验,可在实验室切取10—20个圆片并直接用尺去量. 所得到的平均值可作为实验圆片的近似的起始直径. 记住实验植物和圆片(在1号培养皿中的圆片除外)勿暴露在白光下直至最后的测量.

在1号培养皿中的圆片在实验开始时,在室温下暴露于亮光15分钟,然后放在暗处. 其他的培养皿(2—7)在实验开始后放在完全黑暗里(如需要则将培养皿用铝箔围起来)在室温下保持3天. 然后用一个适当的尺测量圆片,并记录每个处理圆片的平均直径(毫米). 如果有条件可用解剖镜.

测量:

如表3-1所述,记录以上数据.

表 3-1 平 均 标 准 误 差

参数	符号	测定	处理						
			1	2	3	4	5	6	7
每个处理圆片数	N	—	10	10	10	10	10	10	10
圆片直径的总和(毫米)	$\sum x$	$\sum x=x+x\cdots$,等等							
平均直径/处理	$\bar{x}$	$\bar{x}=\frac{\sum x}{N}$							
个别直径平方的总和	$\sum(x^2)$	$\sum(x^2)=x^2+x^2+x^2\cdots$,等等							
直径平方的总和	$(\sum x)^2$	$(\sum x)^2=(\sum x)(\sum x)$							
校正因数	CF	$CF=\frac{(\sum x)^2}{N}$							
从平均平方得出的个别直径的总和	$\sum X^2$	$\sum X^2=\sum(x^2)-CF$							
平均标准误差	$S_{\overline{X}}$	$S_{\overline{X}}=\sqrt{\frac{\sum X^2}{N(N-1)}}$							

结果和结论

从记录在表 3-1 的数据中,测定每个处理的平均标准误差和标准误差的范围. 为了更好地评价,可采用全班的结果.

用每个处理的圆片直径作为纵坐标,以处理数目为横坐标划一曲线图.

在结论里,解释涉及到不同离子和光对叶圆片扩大的影响的数据.

参 考 文 献

Arkin, H. and R. R. Colton. 1957. Statistical Methods, 4th ed. College Outline Series. Barnes and Noble, New York.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 287-309.

Johnson, R. C. and D. M. Morris. 1956. Guide to Elementary Statistical Formulas. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.

Lewis, A. E. 1966. Biostatistics. Reinhold Publ. Corp., New York.

Miller, C. O. 1951. Promoting effect of cobaltous and nickelous ions on expansion of etiolated bean leaf disks. *Arch. Biochem. Biophys.* 32; 216-218.

Snedecor, G. W. 1961. Statistical Methods. The Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa.

实验 4　花椰菜组织中总的可溶性碳水化合物的测定

目的

用蒽酮试剂及标准比色方法测定花椰菜组织中总的可溶性碳水化合物量.

材料

花椰菜头;
100 毫升葡萄糖溶液(10 毫克葡萄糖/100 毫升 H_2O);
200 毫升蒽酮试剂(见书后附录);
125 毫升酒精(80%);
18 个试管;
滴定管(50 毫升);
水浴器(500 毫升烧杯或同类物);
三角架或环架和夹子;
本生灯;
比色计或分光光度计和样品杯;
研钵和研杵;
布氏瓷漏斗和吸滤瓶;
滤纸(Whatman No. 1);
3 支移液管(1 毫升刻度);
2 支移液管(5 毫升刻度);
离心机.

步骤

A. 不同浓度葡萄糖的标准曲线

吸取如下葡萄糖溶液(10 毫克/100 毫升水)的量分别加到相应的带标记的试管：0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 毫升. 加入蒸馏水使每个试管的总体积调整到 3 毫升. 加 3 毫升水到另一个管中，作为试剂空白.

在所有的试管中用滴定管准确地加 6 毫升蒽酮试剂，并轻轻振荡. 将所有试管放在沸水浴中 3 分钟，以后将其浸入冷水浴中使它冷却.

冷却后用合适的分光光度计或比色计在 600 毫微米，记录读数. 查阅关于比色原理参考资料和所用仪器的操作指导. 标绘出按微克葡萄糖量计的光密度(见图 4-1).

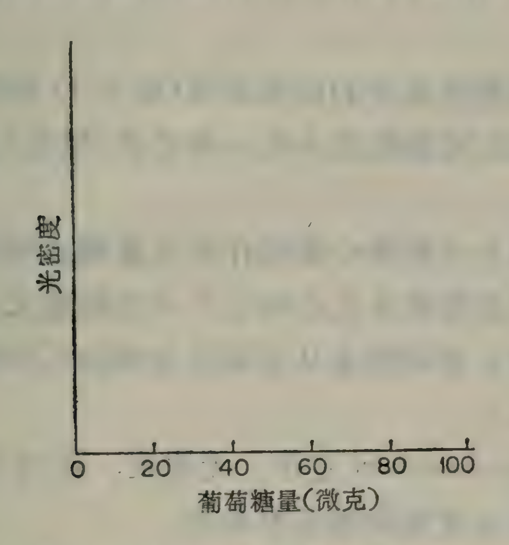


图 4-1　不同浓度葡萄糖的标准曲线

B. 花椰菜中可溶性碳水化合物的测定

准确地称取 1.0 克花椰菜组织，并在研钵中用 80%乙醇

20毫升用力地研磨成匀浆，通过滤纸抽滤，保存滤液.

用80%的乙醇从 Whatman No.1 滤纸上冲洗下残渣并在80%乙醇中重新研磨，再过滤，并再重复研磨和过滤过程一次.

第三次研磨和过滤后，弃去残渣，并合併所有滤液. 用80%乙醇将滤液体积定容到100毫升，并在10000×g离心15分钟得到透明上清液.

吸取0.2、0.4、0.5毫升上清液分别加入试管中. 照同样的作法准备另外3个试管作为每份的重复.

把所有试管放在沸水浴中，使乙醇蒸发. 冷却后，每个试管加3毫升蒸馏水并使其混合. 加3毫升水到另一个干净的试管中作为试剂空白. 在所有的试管中加6.0毫升的蒽酮试剂，并再重复上述的试验步骤.

结果和结论

用已知葡萄糖浓度的标准曲线(图4-1)所得的结果来测定花椰菜组织的可溶性碳水化合物的量(微克/克提取的植物材料).

在总结报告中解释分离操作和用蒽酮试剂测定碳水化合物的反应. 可溶性碳水化合物这个术语的意义是什么？包括什么种类的糖？葡萄糖是从花椰菜分离的可溶性碳水化合物中唯一的糖么？

应用 Beer-Lambert 定律、光密度、百分透光度等比色原理说明不同浓度葡萄糖标准曲线.

参 考 文 献

Bonner, J. and J. E. Varner (Eds.) 1965. Plant Biochemistry. Academic Press, New York and London.

Brode, W. R. 1952. Chemical Spectroscopy, 2nd ed. John Wiley

and Sons, Inc., New York.

Clark, J. M., Jr. (Ed.) 1964. Experimental Biochemistry. W. H. Freeman and Co., San Francisco and London.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 127-152; 216-218.

Gillam, A., and E. S. Stern. 1958. Introduction to Electronic Absorption: Spectroscopy in Organic Chemistry, 2nd ed. St. Martin's Press, New York.

Harrow, B., E. Borek, A. Mazur, G. C. H. Stone, and H. Wagreich. 1955. Laboratory Manual of Biochemistry, 4th ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia and London.

Morrison, R. T. and R. N. Boyd. 1966. Organic Chemistry, 2nd ed. Allyn and Bacon, Inc., Boston, Massachusetts.

Robinson, T. 1967. The Organic Constituents of Higher Plants, 2nd ed. Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minnesota.

实验 5　碳水化合物简易试法

目的

用标准试法测定植物组织中存在的简单碳水化合物的示范.

材料

各种植物材料：苹果、芹菜叶柄、胡萝卜、葡萄、洋葱、芜菁等等；

7 种 1%(重量/容量)糖溶液：葡萄糖、阿拉伯糖、果糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖和核糖；

6 种试剂(见书后附录)：

Molich, Barfoed, Bial, Seliwanoff, Benedict 和苯肼；

30 毫升硫酸(浓)；

60 毫升盐酸(浓)；

10 毫升盐酸(0.1 N)；

5 毫升防腐剂〔1%(容量/容量)百里酚溶于甲苯〕；

10 毫升 $Ba(OH)_2$(饱和溶液)；

每个试验 7 个试管；

显微镜；

载片和盖片；

石蕊试纸；

研缽和研杵.

步骤

A. Molisch 试法

用葡萄糖、阿拉伯糖、果糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、核糖和水的第一个字母标记 8 个试管，每个试管加 5 毫升相应的 1% 糖溶液或水(对照)．将两滴 Molisch 试剂和每种糖溶液及对照混合，然后倾斜试管并沿内壁小心地倒入 2 毫升浓 H_2SO_4，在接触的地方形成紫红色，就表示有糖存在．比较各试管中反应的相对程度，并在表 5-1 中记录你的结果．用所提供的植物材料重复试验(见 H 部分)，并记录结果．

B. Barfoed 试法

5 毫升的 Barfoed 试剂加 1 毫升 1%的糖溶液在试管中煮沸，以 1 毫升水加 5 毫升试剂作为对照，将试管放置 4—5 分钟加以比较．红色氧化亚铜沉淀表示为正反应．在表 5—1 中记录你的结果．以所提供的植物材料重复试验并记录结

表 5-1 碳水化合物试验的结果*

碳水化合物	Molisch	Barfoed	Bial	Seliwanoff	Benedict	苯肼
葡萄糖						
阿拉伯糖						
果糖						
麦芽糖						
乳糖						
蔗糖						
核糖						
对照(H_2O)						
植物材料						

* 用减号(－)表示负结果，用加号(＋)表示正结果；正反应的相对程度用增加加号的数目表示；画出苯肼试法形成结晶类型的草图．

果.

C. Bial 试法

吸取 4 毫升 1%的各种糖溶液分别加入各试管中,另外预备一个 4 毫升蒸馏水的试管,向各试管加入 2 毫升 Bial 试剂,随后加入 5 毫升浓盐酸,使其混合,并用棉花塞住试管,在沸水浴上加热 10 分钟. 从绿色到深蓝色的变化表示为正反应. 记录这些结果于表 5-1 中. 用所提供的植物材料重复试验并记录结果.

D. Seliwanoff 试法(对酮糖专一的定时显色试法)

在用葡萄糖、阿拉伯糖、果糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、核糖和水第一个字母标记的 8 个试管中,各加 3 毫升 Seliwanoff 试剂,每个试管加 3 滴 1%相应的糖溶液或水.

将 8 个试管同时在沸水上加热,直到在一个试管中出现深红色或红色沉淀为止. 如果加热时间足够长,则其他糖溶液也同样显示出正反应. 然后记录糖所引起的正反应的顺序和 20 分钟后的反应程度.

E. Benedict 试法

在用葡萄糖、阿拉伯糖、果糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、核糖和水的第一个字母标记的 8 个试管中,各加入 5 毫升 Benedict 试剂,加入约 5 毫升的水或 1%糖溶液到相应标记试管中,在沸水浴上加热 10 分钟. 橘红至红色沉淀的形成表示还原糖的存在. 记录反应的相对程度. 用所提供的植物材料重复试验,并在表 5-1 中记录结果.

F. 苯肼试法

小心：苯肼是很毒的，要避免接触皮肤和吸进气体，不要使用吸液管!

在分别标记的试管中，加 2 毫升 1 %的每种糖溶液 和 蒸馏水，每个试管中加 5 毫升新制备和过滤的苯肼混合物，并置于沸水浴中 30 分钟.

使试管慢慢冷却并注意何时形成结晶. 将少量结晶转移到载片上，用显微镜观察. 注意哪些糖有同样的结晶 和 哪些糖不形成脎. 用所提供的植物材料重复试验. 在表 5-1 中记录所有的结果.

G. 糖的烯醇化作用

在碱溶液中，醛糖缓慢地转化为酮糖，直到建立平衡就向相反的方向转化. 为了观察这种现象，在试管中制成 如下 混合液：

1. 1 毫升饱和 $Ba(OH)_2$ 加 1 毫升 1 %葡萄糖；
2. 1 毫升饱和 $Ba(OH)_2$ 加 1 毫升 1 %果糖；
3. 1 毫升蒸馏水加 1 毫升 1 %葡萄糖；
4. 1 毫升蒸馏水加 1 毫升 1 %果糖.

每个试管加两滴防腐溶液(甲苯中含 1 %百里香)，并 放置 2 小时. 然后在试管 1 和 2 中各加 2 毫升 0.1 M HCl. 如有必要可另外一滴滴地加 HCl 直到对石蕊呈中性或弱酸性. 加水到其他的试管中(3 和 4)，直到所有试管体积相等.

从每个试管中各取 1 毫升加到每一新试管中，然后 各加 1 毫升的 Seliwanoff 试剂，将它们同时放入沸水浴中. 注 意各管颜色显现的顺序，5 分钟末比较各试管颜色的深浅.

观察糖的烯醇化作用：

H. 应用植物材料的试验

各种植物材料，如甘薯、苹果、葡萄、芹菜叶柄、谷类胚芽、芜菁、洋葱都可用于碳水化合物的试验. 在研缽中研磨后过滤可得到汁液，用与各种糖等体积的滤液；也可以用切得很细的碎片或在研缽中磨成的浆直接作为试验材料.

结果和结论

在表 5-1 中记录各试管所得结果；将所得结果表示出糖的烯醇化作用.

在总结报告中，考虑碳水化合物的结构、分类的根据和它的一般生物学作用. 此外，解释你的结果，指出每个试验所包含的基本反应序列和它对糖的测定是一般的还是专一的.

参考文献

Bonner, J. and J. E. Varner (Eds.) 1965. Plant Biochemistry. Academic Press, New York and London.

Clark, J. M., Jr. (Ed.) 1964. Experimental Biochemistry. W. H. Freeman and Company, San Francisco and London.

Doby, G. 1965. Plant Biochemistry. Interscience Publ., London, New York and Sydney.

Harrow, B., E. Borek, A. Mazur, G. C. H. Stone, and H. Wagreich. 1955. Laboratory Manual of Biochemistry W. B. Saunders Co., Philadelphia and London.

Hawk, P. B., B. L. Oser, and W. H. Summerson. 1947. Practical Physiological Chemistry, 12th ed. The Blakiston Co., Inc., Toronto and New York.

Morrison, R. T. and R. N. Boyd. 1966. Organic Chemistry. Allyn and Bacon, Inc., Boston.

Shriner, R. L., R. C. Fuson, and D. Y. Curtin. 1964. The Systematic Identification of Organic Compounds, 5th ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.

实验 6　纸上层析分离糖

目的

表明用纸上色层析谱分离糖的基本技术.

材料

未知溶液(使用以下任何一种溶液): 2—3 种未知溶液，每一种含有 1%（重量/容量）浓度两种不同的糖；大戟属(*Poinsettia*)或马利筋属(*Asclepsis*)花的蜜腺的液体；花椰菜或其他植物材料的 80% 乙醇抽提液；

8 种每一种 1%(重量/容量)的糖溶液：葡萄糖、果糖、鼠李糖、蔗糖、阿拉伯糖、核糖和半乳糖；

300 毫升溶剂 I (叔-丁醇:冰醋酸:水;3:1:1)；

300 毫升溶剂 II (酚:水;4:1)；

对茴香胺喷洒剂(见书后附录)；

2 个玻璃缸(10×18 吋)；

2 个磨砂玻璃盖；

活塞油；

烘箱(80°C)；

喷雾器和瓶子(或其他喷洒装置)；

层析纸(Whatman No. 1, 大张)；

米尺；

剪刀；

微量移液管.

步骤

A. 准备层析谱箱

色层析谱必需在有毛玻璃板作盖的玻璃缸中进行（如果不能采用，可以使用有螺旋盖的大尺寸的泡菜缸）．保证缸是密封的，边缘必须涂上活塞油或凡士林，但是不要用量过多．

需要两个缸：一个用溶剂Ⅰ（叔-丁醇:冰醋酸:水；3:1:1），另一个用溶剂Ⅱ（酚:水；4:1）．从缸外边测量每一个缸必需有半吋高的相应的溶剂．盖上缸盖，用前使内部的空气平衡几小时．

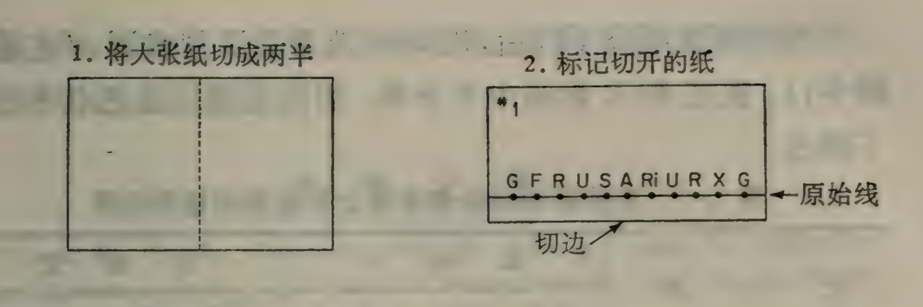
B. 层析谱的制备和显谱（见图 6-1）

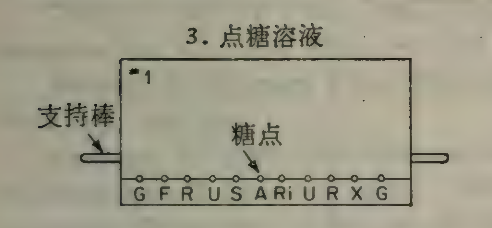
把一大张层析谱纸（Whatman No. 1）沿着短边切成两半，注意避免接触可以增加干扰物质的手或其他表面．如果使用的层析谱缸小于指定的尺寸，色层谱纸可切成四份．采用稍微改变的实验步骤．

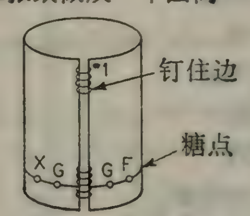
切成两半的纸放在清洁的桌面上，长的一边与桌子边缘平行，在长边一边的上方 2 吋处划一条铅笔线，沿着线点一系列 1 吋间隔的铅笔点．标记这些点为葡萄糖、果糖、鼠李糖、未知、蔗糖、阿拉伯糖、核糖、未知、鼠李糖、木糖、半乳糖（图 6-1）．两张纸必须重复，但是要放在不同的溶剂系统中．

纸张放在像玻璃管或米尺这样的支持物上，使铅笔点离开桌面．

用一个微量移液管间歇地点 3 微升糖溶液（约 30 微克糖）在相应的点上．在两次点糖之间，每次确实保证糖点干了．用在材料一节中指明的未知溶液或者由教师用同一方式提供的未知溶液来点样．







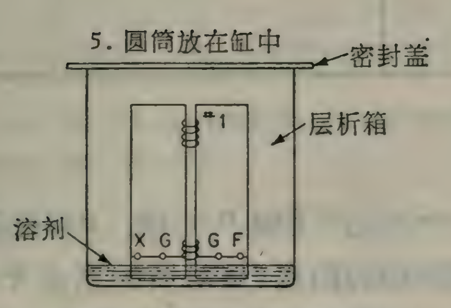


图 6-1 糖的纸上层析谱

当糖点干了的时候，钉层析谱纸成一个圆筒，在近底部有一排点. 用足够的订书钉保持圆筒直立在有溶剂的器皿中. 为了方便，可以让层析谱过夜，更合适是从午后 11 时 到 早晨 8—10 小时. 放置每一张纸在各自的箱中后，盖好盖子，层析谱一直放到溶液前缘接近纸的上边. 记住这个操作需要10—12 小时，因此要做好计划.

展开层析谱以后拿出纸筒，标出溶剂前缘按纸筒原来方向悬挂并干燥.

当层析谱纸全干以后，用对 p-茴香胺试剂喷洒，(在通风橱中!)，放在 80°C 烘箱中 3 分钟，用铅笔圈出显色点并且记下颜色.

表 6-1 糖的标准和未知溶液上行纸层析谱的结果

化合物	溶剂 I			溶剂 II		
	Rf	Rrh	颜色	Rf	Rrh	颜色
葡萄糖						
果糖						
鼠李糖						
未知						
蔗糖						
阿拉伯糖						
核糖						
未知						
鼠李糖						
木糖						
半乳糖						

结果和结论

计算每一个点的 Rf 和 Rrh 值. Rf 值是测定溶质糖移动的距离被溶剂移动的距离(从溶质的原点开始计算)除的比例所得到的. Rrh 值等于从原点起始糖的移动对鼠李糖移动的比值.

在表 6-1 中记录得到的每一种糖的 Rf 和 Rrh 值以及点的颜色. 颜色给予一些帮助. 例如，己醛糖应产生绿-棕色，戊醛糖呈黄色，糖醛酸红色，甲基戊碳糖绿色，脱氧核糖浅棕色. 双糖一般反应为棕色色调. 未知物点与标准糖点的 Rf、Rrh 和颜色进行比较，就能自由估计未知物中是不是含有某些已知的糖.

在总结意见中考虑纸层析谱中的一些原理，特别强调分

配、表面吸附和离子交换．解释极化、分配系数、移动原始相、静止水相名词的意义．

参 考 文 献

Block, R., E. L. Durrum, and G. Zweig. 1958. A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, 2nd ed. Academic Press, New York.

Clark, J. M., Jr. (Ed.) 1964. Experimental Biochemistry. W. H. Freeman and Co., San Francisco and London.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 127-133.

Lederer, E. 1963. Chromatographic methods of separation. In: P. Eckstein and F. Knowles (Eds.) Techniques in Endocrine Research. Academic Press, New York. pp. 87-104.

Lederer, E. and M. Lederer. 1957. Chromatography, 2nd ed. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey.

Smith, I. 1960. Chromatographic and Electrophoretic Techniques. William Heinemann Med. Books Ltd., London and Interscience Publ., Inc., New York.

Stein, W. H. and S. Moore. 1951. Chromatography. *Sci. Amer.* 184 (3): 35-41.

Williams, R. J. and H. Kirby. 1948. Paper chromatography using capillary ascent. *Science* 107: 481-483.

实验 7 淀粉的分离和性质

目的

分离和研究淀粉的性质，证明淀粉酶和磷酸化酶的活性。

材料

马铃薯；

10 颗玉米粒（浸在 25°C 流动自来水中 24 小时）；

8 粒大麦种子[起初浸在 50%（容量/容量）硫酸中一小时半，然后浸在流动自来水中 24 小时（25°—30°C）]；

4 个培养皿 [内有 1.0% （重量/容量） 琼脂 平 面 中 有 0.15%（重量/容量）淀粉溶液]；

4 个培养皿 [内只有 1.5% （重量/容量） 琼脂平面]；

4 个培养皿[内有 1.5%（重量/容量）琼脂平面中有0.5%（重量/容量）的 1-磷酸葡萄糖]；

碘试剂（I_2KI）（见书后附录）；

磷酸-柠檬酸缓冲剂 pH 5.6（见书后附录）；

0.5%（重量/容量）淀粉溶液（见书后附录）；

Benedict 试剂（见书后附录）；

天平；

组织捣碎机；

薄棉布；

离心机；

锥形离心管；

10 个试管；

研钵和研杵；

滴试板；

解剖用具；

显微镜；

显微镜载片和盖片.

步骤

A. 从马铃薯分离淀粉

50 克去皮切成片的白色马铃薯加 100 毫升蒸馏水放在组织捣碎机中捣碎 2 分钟. 用四层薄棉布过滤匀浆，使滤液放置 3 分钟. 弃去棉布上残渣.

小心倾倒出滤液，保留淀粉沉淀. 用极少量水转移淀粉到 12 毫升锥形离心管中，约在 2400 rpm 离心 2 分钟. 倒出，弃去上面清液.

再将淀粉悬浮在水中冲洗（加足够的水，装到离心管的 3/4），在 2400 rpm 再离心 2 分钟. 重复冲洗操作，以后再悬浮 1/2 淀粉到 1—2 毫升水中. 盖好离心管（用合适的盖子或大姆指）强烈振动.

把摇好的材料倒在有 100 毫升沸水的 250 毫升烧杯中. 把烧杯放在冷水浴中冷却，当溶液正在冷却时加入 100 毫升蒸馏水，用玻璃棒搅动. 溶液到达室温时就可以使用.

B. 淀粉的性质（碘试法）

放 2 滴抽提的淀粉溶液到试管中，加入 3 毫升蒸馏水，加 1 滴碘溶液到混合物，注意颜色. 放几滴有色的混合物在显微镜载片上，用显微镜观察. 放其余的溶液在水浴中加热到

看见颜色的改变．从水浴中拿出试管，在冷水浴中冷却．记下结果．用已知的5％可溶淀粉溶液重复．

观察：

C. 发芽大麦种子的淀粉酶对淀粉的作用

在研缽中，加4.0毫升磷酸-柠檬酸缓冲溶液（pH 5.0），慢慢研磨8个发芽的大麦种子（先浸在50％〈容量/容量〉H_2SO_4中，以后在25°C流动自来水中浸24小时）．小心倒出液体到12毫升锥形离心管中，在2400 rpm离心2分钟．在4个试管中加入0.5毫升上清液，2个试管在沸水浴中加热4分钟，放置冷却，如果液体逸失，用同量的缓冲溶液加进去．

在4个试管中加入0.5毫升可溶性淀粉溶液（0.5％，重量/容量）或马铃薯淀粉溶液（2个加热，2个不加热）在2，5，15和20分钟测定每个试管中淀粉含量．2滴溶液和1小滴碘溶液在一个比色板中已足够．取每一种溶液2滴用Benedict试剂试验．

观察：

D. 用玉米盾片的淀粉酶水解淀粉

实验前将玉米浸在自来水中24小时．

制备含有0.15％可溶性淀粉的1％琼脂平面，琼脂与淀粉一齐加入到水中，煮沸至琼脂溶解．然后倾倒不大于15毫升淀粉和琼脂溶液到培养皿中．短期试验不必要灭菌，除非

上课前培养皿早已做好。使溶液在温室下凝固.

除去玉米的胚乳,在每一个有淀粉和琼脂平面的培养皿中放入 3 个胚,使盾片接触琼脂,要肯定是盾片而不是胚乳.

在温暖黑暗的地方培养 24 小时.除去胚和倾倒标准 I_2KI 溶液在培养皿琼脂平面上试验淀粉;以后用蒸馏水很快地冲洗.

观察:

E. 用马铃薯磷酸化酶把葡萄糖 1-磷酸转化成淀粉

制备 1.5%琼脂溶液和其它有 0.5%葡萄糖-1-磷酸琼脂的溶液.煮沸,倾倒每一种溶液 15 毫升到有相应标记的培养皿中,使它们凝固.

马铃薯薄片在组织捣碎机中做成匀浆,然后用薄棉布过滤匀浆,目的是除去淀粉粒.用 I_2KI 试验一定数量滤液.重复过滤操作直到用 I_2KI 试验滤液至负反应为止.小心重复过滤应该除去淀粉粒.

放几滴粗制马铃薯提取液在两种不同的琼脂制备物上,在不同时间试验淀粉每次滴 I_2KI 在一个点上,定时比较两份琼脂制备物的结果.

观察:

结果和结论

当使用设计表格或其它方式表明结果时，简洁地叙述你的每一部份的结果.

在你的结论中考虑以下几点：

1．在植物细胞的什么地方找到了淀粉？是什么形式？

2．淀粉的性质：关于淀粉分离，水中的溶解度，碘试剂的染色.

3．淀粉碘复合物加热以后冷却时颜色的变化.

4．和结构的碳水化合物如纤维素比较淀粉的化学本性.

5．直链淀粉和支链淀粉之间的化学区别.

6．磷酸化酶在淀粉合成中的作用.

7．淀粉酶在淀粉降解中的作用，包括反应的有关细节.

参 考 文 献

Advances in Carbohydrate Chemistry. 1945 to 1970. R. S. Tipson and M. L. Wolfrom (Eds.). Academic Press, New York.

Akazawa, T. 1965. Starch, inulin, and other reserve polysaccharides. In: J. Bonner and J. E. Varner (Eds.) Plant Biochemistry. Academic Press, New York and London. pp. 258-297.

Creech, R. G. 1965. Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. Genetics 52: 1175-1186.

Creech, R. G. 1968. Carbohydrate synthesis in maize. *Advan. Agron.* 20: 275-322.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 140-152.

Griswold, R. M. 1962. The Experimental Study of Foods. Houghton Mifflin Co., Boston, Massachusetts. pp. 286-289.

Guthrie, R. D. and J. Honeyman. 1964. An Introduction to the Chemistry of Carbohydrates. Oxford Claredon Press.

Hanes, C. S. 1940. The reversible formation of starch from glucose-*l*-phosphate catalyzed by potato phosphorylase. *Proc. Roy. Soc.* B. 129: 174.

Pazur, J. H. 1965. Enzymes and synthesis and hydrolysis of

starch. In: R. L. Whistler and E. F. Paschall (Eds.) Starch Chemistry and Technology. Vol. I. pp. 133-175.

Robinson, T. 1967. The Organic Constituents of Higher Plants, 2nd ed. Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minnesota.

Whistler, R. L. and M. L. Wolfrom. (Eds.) 1964. Methods in Carbohydrate Chemistry. Academic Press, New York. Vol. IV.

实验 8　核酸的纸上层析法和核糖核酸或脱氧核糖核酸的紫外吸收光谱

目的

用层析谱分离核酸中的主要嘌呤和嘧啶碱基，测定脱氧核糖核酸或者核糖核酸的紫外吸收光谱.

材料

腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶的水溶液(每种的浓度是 2 毫克/毫升)；

层析谱的溶剂(65 毫升异丙醇，16.7 毫升 12 N HCl，最终容积用水稀释到 100 毫升)；

0.1 M 三羟基氨基甲烷-盐酸缓冲液 (pH 7.6，其制备见书后附录)；

RNA 或 DNA 溶液[10 毫克商品核酸 溶于 500 毫升 0.1 M 三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液(pH 7.6)中]；

1 张层析用纸(Whatman No. 1)；

下行层析器；

通风橱；

暗室(用于研究层析谱)；

短波紫外光灯(矿质灯)；

米尺棒；

2 个硅质比色杯；

紫外分光光度计.

步骤

A. 核酸碱基的纸上层析法(下行)

1. 层析箱:

准备下行层析箱,先放一个有溶剂(65毫升异丙酸,16.7毫升 12 N HCl,用水稀释到 100 毫升)的烧杯在层析箱的底部. 用同一溶剂大约装满槽的¾. 盖好层析箱,在使用前使箱内气体达到平衡(约一小时).

2. 层析谱的制备:

裁层析用纸(Whatman No.1)成条形,使之适合于使用的下行层析谱器. 纸的长度必须使溶剂从原始点移到前缘的距离有 35 厘米。

将纸放在一张清洁的桌上,划一条原始线,在纸放进层析箱时,原始线大约距离折叠处 1 吋,在原始线上相距 1—1.5 吋划圆圈(直径约 $^1/_8$ 吋),在每一个圆圈下标出所用的核酸碱基或任何未知物质. 水解的植物提取液的分析由教师决定.

用一个微量移液管点每一种核酸碱基溶液 10—15 微升在标记的圆圈上. 每一次点样后必须使点上的溶液变干(用气流或吹风机).

3. 层析谱的展谱:

开始展谱时,将点好的纸的末端浸在有溶剂的槽底. 在大多数层析谱器具中能同时展现两张层析纸.

展现色谱 15 小时(室温)或者等到溶剂从原始点移到 35 厘米处.

适当的展谱以后,小心地不碰到任何东西地移开纸,放在通风橱干燥. 等到全部干燥以后,在暗室中紫外光灯下(短波

长)观看层析谱. 戴眼镜,不要直接看紫外光源.

用铅笔标记下溶剂的前缘或暗色的紫外光吸收点. 计算 Rf 值,用从原始点到前缘的距离除以原始点到每一个"点"中心的距离.

计算 Rf 值:

B. RNA 或 DNA 的紫外吸收光谱

溶解 10 毫克的 RNA 或 DNA 在 500 毫升的 0.1 M 三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液(pH 7.6)中. 倒入一小部分的这种溶液于二者之一的硅质比色杯中, 另一个比色杯仅作为空白的试剂注满缓冲剂.

把两个比色杯置于一个紫外分光光度计中并在220—300毫微米间检定其吸收光谱. 读取及记录每 5 毫微米核酸溶液的光密度. 指标如超过其量程,在吸收的最大的和最小的点,在 1 毫微米之间采取补充读数. 记录下读数.

结果和结论

为每个根据提出所得到的 Rf 值. 将所得之值与已出版的 Bendich(1957,参阅参考文献)的著作相比较。

为每个 DNA 或 RNA 的紫外吸收光谱绘成图,将读取的光密度作为纵坐标,而波长作为横坐标.

参 考 文 献

Bendich, A. 1957. Methods for characterization of nucleic acids by base composition. In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan. (Eds.) Methods in Enzymology. Academic Press, New York. Vol. III.

Cantoni, G. L. and D. R. David (Eds.) 1966. Procedures in Nu-

cleic Acid Research. Harper and Row, New York.

Chargaff, E. and J. N. Davidson (Eds.) 1955. The Nucleic Acids: Chemistry and Biology. Academic Press, New York. Vol. I.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York, pp. 385-393.

Robinson, T. 1967. The Organic Constituents of Higher Plants, 2nd ed. Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minnesota.

Semenenko, G. L. 1965. Biochemistry of Nucleic Acid Metabolism in Higher Plants. Reinhold Publ. Corp., New York.

实验 9 花椰菜中核酸的提取和检定

目的

为了学习一种比较简单的提取和检定存在于花椰菜组织中核酸的技术.

材料

100 克花椰菜花;

300 毫升乙醇(95%);

200 毫升丙酮;

110 毫升高氯酸(5%;冰冷却);

100 毫升 10%(重量/容量)氯化钠溶液(用 $NaHCO_3$ 调到 pH 7.5);

10 毫升 RNA(商品精制)溶液 (5.0 毫克/100 毫升水);

30 毫升二苯胺试剂(见书后附录);

15 毫升苔黑酚试剂(见书后附录);

组织捣碎机;

瓷漏斗;

滤纸(Whatman No. 1);

水浴器(沸腾);

试管;

离心管;

离心机(化学的).

步骤

A. 核酸的提取

将 100 克花椰菜花与相同体积的 95%的乙醇于组织捣碎机中捣碎 4 分钟. 通过滤纸 (Whatman No. 1) 抽滤匀浆. 丢弃滤液而留其滤渣.

再用 100 毫升 95%的乙醇匀化滤渣, 象前面一样过滤, 并再一次丢弃滤液.

将滤渣重新悬浮于 100 毫升丙酮中并且匀化 4 分钟. 抽吸过滤滤渣匀浆, 继续不停地抽吸直至陷在纸上的滤渣充分干燥为止. 用力压挤滤渣以除去任何剩余的丙酮.

将全干的滤渣悬浮在 100 毫升用冰冷却的 5% (容量/容量)的高氯酸中并再次过滤, 丢弃滤液.

将滤渣悬浮于 100 毫升 95%的乙醇中. 象前面那样过滤并丢弃滤液. 用丙酮作悬浮介质重复这一步骤. 过滤悬浮液, 丢弃丙酮滤液, 并留其滤渣. 一定要用抽吸法使滤纸上的滤渣充分干燥.

将干燥的滤渣重新悬浮在 100 毫升 10% (重量/容量) 的氯化钠溶液中 (一定要用 $NaHCO_3$ 将 NaCl 溶液调到 pH7.5). 在沸水浴中将悬浮液加热 15 分钟, 让其冷却, 并抽吸过滤. 留其滤液 (提取物 1).

将滤渣重新悬浮在 100 毫升 0.5 N 的 $HClO_4$ 中并加热到 70°C (小心!) 保温 20 分钟. 将液体倒出 (提取物 2), 并丢弃残渣. 根据下面标准程序的纲要测定提取物 (1 和 2) 和已知溶液的核酸.

B. DNA 和 RNA 的显色试验

1．二苯胺反应：

分别将 1 毫升蒸馏水、DNA 溶液(5.0 毫克/100 毫升)、RNA 溶液 (5.0 毫克/100 毫升) 以及核酸滤液加到不同的试管中．在每个试管中加入 2 毫升二苯胺试剂并在通风橱中以沸水浴加热 10 分钟．注意颜色的生成和反应特征．

观察：

2．苔黑酚反应：

分别将 1.0 毫升每种试验溶液和水加入不同的试管中．然后在每个试管中加入 1 毫升苔黑酚试剂．在水浴中将试管加热 10 分钟．注意所产生的颜色．

观察：

结果和结论

提出你的结果和结论，包括核酸的一般分离步骤和检定的基本原理．考虑在用于检定核酸的试验中，关于二苯胺和苔黑酚反应的本质以及它们对 RNA 和 DNA 的专一性．怎样用这二种试验测定提取液中核酸存在的相对量？

参 考 文 献

Bendich, A. 1957. Methods for characterization of nucleic acids

by base composition. In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan (Eds.) Methods of Enzymology. Academic Press, New York. Vol. III.

Chargaff, E. and J. N. Davidson (Eds.) 1955. The Nucleic Acids: Chemistry and Biology. Academic Press, New York. Vol. I.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp. New York. pp. 385-393.

Gibor, A. and M. Izawa. 1963. The DNA content of the chloroplasts of Acetabularia. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **50**: 1164-1169.

Ingle, J. 1963. The extraction and estimation of nucleotides and nucleic acids from plant material. *Phytochem.* **2**: 353—370.

Martin, P. G. 1966. Variation in the amounts of nucleic acids in the cells of different species of higher plants. *Exp. Cell Res.* **44**: 84-94.

Ogur, M. and G. Rosen. 1950. The nucleic acids of plant tissue. I. The extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Arch. Biochem.* **25**: 262-276.

Pollard, C. J., A. Stemler, and D. F. Blaydes. 1966. Ribosomal ribonucleic acids of chloroplastic and mitochondrial preparations. *Plant Physiol.* **41**: 1323-1329.

实验 10 腺苷水解酶

目的

学习在从花椰菜中提出的一种专一的核苷酶存在时，腺苷分解为腺嘌呤的酶水解作用.

材料

16 克花椰菜；

50 毫升 0.1 M 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)缓冲液，用 HCl 调到 pH 7.4；

13 毫升腺苷溶液(2 毫克/毫升；用 pH 7.4 的 0.1 M 三羟甲基氨基甲烷缓冲液配制)；

200 毫升硼酸溶液(0.03 M；用 NaOH 调到 pH 8.4)；

纱布；

棉花；

漏斗；

4 支毛细吸管(或医用滴管拉出一个细尖)；

冰浴器；

沸水浴器；

2 张层析纸(Whatman No. 1, 28 厘米 × 23 厘米)；

2 个层析箱(与滤纸卷成圆筒状相适应)；

短波紫外光源(矿质灯)；

4 个管形瓶或小试管.

步骤

为使此实验在一堂课内完成，应当两个或者更多的学生一起做.

A. 酶的制备

在酶的制备中所用的一切试剂和玻璃器皿都应当冷冻.

取 15 克花椰菜花，加 15 毫升冷的三羟甲基氨基甲烷缓冲液(pH 7.4)，在冷的研钵中研磨. 通过双层纱布挤压研磨液，挤出液通过一个垫有少量玻璃纤维的漏斗. 得到的滤液含有酶，并应当冷藏，用于后面的实验. 此外，制备少量钝化的酶. 在一个干净的试管中加入 3 毫升滤液，在沸水浴中加热 15 分钟，取出试管. 如果在加热过程中液体有所损失，则用缓冲液将体积再调到 3 毫升. 此制剂含有钝化的酶，并且在指明的地方使用煮过的酶.

B. 在腺嘌呤产生的基础上酶活性的鉴定

准备 28 厘米×23 厘米的层析纸 (Whatman No. 1) 一张. 将纸的长边和实验桌的顶边平行摆正，在离底部大约 1 吋的地方，沿着纸的长轴划一条线.

按下面所讲的，把反应混合物成分加到一个小的玻璃容器中(到开始反应前，不加酶)：

1. 1.0 毫升三羟甲基氨基甲烷缓冲液(pH 7.4)＋1.0 毫升滤液；
2. 1.0 毫升腺苷(2 毫克/毫升)＋1.0 毫升滤液；
3. 1.0 毫升腺苷(2 毫克/毫升)＋1.0 毫升滤液 (煮过)；
4. 1.0 毫升腺苷(2 毫克/毫升)＋1.0 毫升缓冲液 (pH 7.4).

因为滤液可能有很高的活性，所以需要几组学生用不同数量的滤液(例如 0.2,0.4,0.6,0.8 毫升滤液)进行实验，因而能够说明腺苷变为腺嘌呤所用的时间．为此，用缓冲液调节反应混合物的最终体积．

在开始反应之后，立即摇动混合液，并且将每一种少量混合液点在层析纸开始线的各个点上．一定从左(距边沿大约 $\frac{1}{2}$ 吋)到右，所用的各个反应混合液不要重叠．

标记四个点，这一组为零时，30 分钟后由第一组的右边再点上四种混合液，标记这一组为 30 分钟．

过了一个半小时，以 30 分钟为间隔重复点样步骤，这样最后有 2 个小时反应时间，你已做了 5 组实验，每一组由 4 个不同混合液的点组成．假如需要，可以利用另一张层析纸．然后将纸作成圆筒，在一个层析箱内用 0.03 M 硼酸(pH8.4)作为上升的溶剂展开．对于层析和观察增加课外的时间是需要的．因此计划要适当．

一个多小时后，溶剂即推动到圆筒的顶端．另外，腺苷移动到比腺嘌呤接近溶剂前沿．在纸谱上干了之后，腺苷和腺嘌呤能够用紫外光灯检查出来．记录每一种化合物随着反应时间的相对强度，计算每一种紫外光-淬熄化合物的 Rf 值，在一个相对的基础上利用加号说明结果．

观察：

结果和结论

列出在特定的溶剂系统中腺苷和腺嘌呤的 Rf 值．指出在层析谱上不同时间鉴定腺嘌呤和腺苷的相对量．

在结论中说明结果，列出方程式说明研究的反应．并回答以下问题：

时间对酶活性的影响如何？影响酶活性的其他因素是什么？所提出的核苷酶对用在反应混合液的核苷是否专一？在完整植物中核苷水解酶可能有什么意义？

参 考 文 献

Heppel, L. A. and R. J. Hilmore. 1952. Phosphorylases and hydrolysis of purine ribosides by enzymes from yeast. *Biol. Chem.* **198**: 683-694.

Mazelis, M. 1959. Enzymatic degradation of adenosine triphosphate to adenine by cabbage leaf preparations. *Plant Physiol.* **34**: 153-158.

Mazelis, M. and R. K. Creveling. 1963. An adenosine hydrolase from brussels sprouts. *J. Biol. Chem.* **238**: 3358-3361.

实验 11　蛋白质及其衍生物的试验

目的

为了表明使用标准试验鉴定存在于植物材料中的蛋白质.

材料

80 克玉米种子(在流动的自来水中浸泡 24 小时);
30 毫升鸡蛋蛋白溶液(1%;重量/容量);
9 毫升 KOH(20%;重量/容量);
3 毫升 KOH(10%;重量/容量);
3 毫升 $CuSO_4$(0.5%;重量/容量);
3 毫升硝酸(浓的);
15 毫升 H_2SO_4(浓的);
6 毫升 HCl(浓的);
吡啶(在滴瓶中);
NaOH(1 N,在滴瓶中);
3 毫升 $Na_2S_2O_4$(2.0%;重量/容量);
丁二酮(1%;重量/容量,在滴瓶中);
3 毫升 1,2-萘醌-4-硫酸钠(0.5%;重量/容量);
分离试验溶液和试剂(见书后附录):(水合)茚三酮、米隆试剂、二羟醋酸、氰化钠、亚硫酸钠;
研钵和研杵;
滤纸;

移液管(刻度的:1,5 及 10 毫升);

瓷漏斗和支臂烧瓶;

水浴器;

本生灯;

每个试验准备 3 支试管.

步骤

A. 从发芽的玉米种子制备提取物

在流动的自来水下,将玉米种子浸泡一夜. 将 80 克浸泡的玉米种子加约 30 毫升水,在磨钵中研磨. 用瓷漏斗过滤,并用 15 毫升水洗涤残渣. 将滤液合併,用作下面的试验.

B. 蛋白质试验

后面的每个试验都要用水作为空白,1%的鸡蛋蛋白液和玉米提取液. 将你观察的结果记入表 11-1.

1. 缩二脲试验:

取 3 毫升试液,加等容积的浓 KOH(约 20%),充分混合,并慢慢加入 0.5%的 $CuSO_4$ 1 毫升,注意颜色的缓慢变化.

2. 茚三酮试验:

取 3 毫升试液,加 0.5 毫升 0.1%的茚三酮(茚满三酮合水)溶液和 2 滴吡啶. 在沸水浴中加热,直到颜色的变化证明是阳性试验.

3. 黄蛋白试验:

取 3 毫升试液,加 1 毫升浓硝酸,则形成白色沉淀. 煮沸直至沉淀改变颜色(注意颜色). 冷却并加过量的碱注意颜色的变化.

4. 米隆(Millon)试验:

表 11-1 蛋白质试验结果

试验	试验物质	颜色及沉淀	正 负
双缩脲反应	水 鸡蛋蛋白 玉米提取物		
茚三酮反应	水 鸡蛋蛋白 玉米提取物		
黄蛋白反应	水 鸡蛋蛋白 玉米提取物		
煮沸之后	鸡蛋蛋白 玉米提取物		
过量的碱	鸡蛋蛋白 玉米提取物		
米隆(Millon)反应	水 鸡蛋蛋白 玉米提取物		
霍普金斯-科尔(Hopkins-Cole)反应	水 鸡蛋蛋白 玉米提取物		
沙利文(Sullivan)反应	水 鸡蛋蛋白 玉米提取物		
丁二酮反应	水 鸡蛋蛋白 玉米提取物		

取2毫升试液加几滴米隆氏试剂加热并注意颜色的形成.

5．霍普金斯-科尔(Hopkins-Cole)试验:

将3毫升试液与3毫升二羟乙酸试剂在一试管中混合. 在另一试管中放入5毫升浓 H_2SO_4. 倾斜第二个试管并将第

一个试管中的混合物轻轻地倒入硫酸的上面.液体分成二层，如果试验呈正反应，界面上则呈现颜色反应．记住用水的空白和玉米提取液做同样的试验．

6．沙利文(Sullivan)试验：

将每种试液 6 毫升加 2 毫升浓 HCl，煮沸 15 分钟．用刚果红试纸作指示剂，加 NaOH 中和．加 1 毫升用 0.8 N NaOH 配制的 1%的氰化钠（小心有毒!）．加 1 毫升新鲜的 0.5% 的 1，2-萘醌-4-硫酸钠溶液和溶于 0.5 N NaOH 中的 15%的 Na_2SO_3 5 毫升．让混合物在 20°C中停 30 分钟．然后加 1 毫升 2%的 $Na_2S_2O_4$．记录颜色变化．

7．丁二酮试验：

将每种试液 5 毫升加 10%的 KOH 1 毫升，并加 1 滴 1% 的丁二酮．注意颜色和荧光的变化．

结果和结论

在结束语中，考虑对于肽键、结构(一级、二级和三级)的蛋白质化学和蛋白质的生物学作用．假如它是特殊的或一般的测定蛋白质试验，说明每一个试验的基本反应．

参 考 文 献

Alexander, P. and R. J. Block. 1960—1961. Laboratory Manual of Analytical Methods of Protein Chemistry. Pergamon Press, Inc., New York. Vols. I, II, and III.

Clark, J. M., Jr. (Ed.) 1964. Experimental Biochemistry. W. H. Freeman and Co., San Francisco and London.

Criddle, R. S. 1969. Structural proteins of chloroplasts and mitochondria *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20: 239-252.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., Now York. pp. 374-393.

Fowden, L. 1965. Origins of the amino acids. In: J. Bonner and J. E. Varner (Eds.) Plant Biochemistry. Academic Press, New York and London. pp. 361-390.

Haurowitz, F. 1950. Chemistry and Biology of Proteins. Academic Press, New York.

Hawk, P. B., B. L. Oser, and W. H. Summerson. 1947. Practical Physiological Chemistry, 12th ed. The Blakiston Co., Inc., Toronto and Philadelphia.

Holley, R. W. 1965. Protein metabolism. In: J. Bonner and J. E. Varner (Eds.) Plant Biochemistry. Academic Press, New York and London, pp. 346-360.

Robinson, T. 1967. The Organic Constituents of Higher Plants, 2nd ed. Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minnesota.

Stahmann, M. A. 1963. Plant Proteins. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **14**: 137-158.

实验 12 双向纸上层析分离氨基酸

目的

为了说明氨基酸双向纸上层析的分离技术.

材料

30 克去皮的白色马铃薯;

10 毫升含有丙氨酸、酪氨酸、丝氨酸、谷氨酸的氨基酸混合液(每种氨基酸的浓度——1 毫克/毫升 0.5 N 乙酸);

100 毫升 80%的乙醇(容量/容量);

350 毫升苯酚溶剂(水饱和的苯酚);

350 毫升丁醇溶剂(正丁醇:冰醋酸:水;3:1:1);

茚三酮喷显剂(参看书后附录);

滤纸(Whatman No. 1);

瓷漏斗和侧臂烧瓶;

配衡称量皿;

层析纸(Whatman No. 1);

层析缸;

2 个微量移液管;

钉书机,书钉(或棉线);

烘箱(恒温在 90°C);

喷雾器和瓶(或另外合适的喷雾装置).

步骤

A. 氨基酸的提取

用 100 毫升 80%的乙醇研磨约 30 克 去掉皮的白色马铃薯. 用瓷漏斗过滤,滤液在室温减压蒸发干燥,蒸发的最后阶段在配衡皿中进行,这样就可以估计得到的固体 的 量. 在使用前将残渣重新溶于足够的蒸馏水中,配成约每毫升水 含 30 毫克固体.

B. 纸上层析箱

层析可以在有毛玻璃板作为盖的 10 吋×18 吋 硬玻璃缸中进行. 缸的边缘可以涂上活塞油膏,但是不能使用过量.

四个缸是需要的: 两个用于苯酚溶剂(小心! 苯 有 腐蚀性,有毒!). 另外两个缸用于正丁醇、乙酸、水混合液. 在每一个缸里的溶剂深度约为½吋.

在放入溶剂之后,立即盖上缸盖,让 内 部 气 体平衡几小时.

C. 层析谱的制备和展开

将一大张滤纸 (Whatman No. 1) 切成 4 份, 小心避免用手指或其他表面接触滤纸,这可能造成干扰的杂质.

放置两张四分之一的滤纸在一个干净的表面上, 纸的长轴和桌边缘平行. 在每一张纸上距左边缘两吋距底部 1.5 吋的地方用铅笔作一个轻微的点,在每一张纸的较 低 边缘写个"酚"字,纸的编号为 1 和 2.

将纸铺在如玻璃板之类的支持物上, 使 铅笔点在板的面上,利用一个微量滴管点 3 微升马铃薯提取液在 1 号 纸 的铅

笔点上，但是不能一次全都点上，要缓慢和间歇进行，使最后斑点的直径大约为1厘米. 在2号纸上点教师准备好的已知的氨基酸混合液.

当斑点干燥之后，每张纸作成一个圆筒，有酚记号的边作为底部，用足够的书钉(棉线)保持圆筒坚固，但是在纸的两个边缘之间留一个空隙. 层析谱展开在这个溶剂里需要10—12个小时，因此要计划适当. 将圆筒直立的放在含有酚溶剂的一组缸内，盖上缸盖，直到溶剂前沿接近纸的上部边缘时为止，将纸筒拿出，溶剂前沿作上记号，按它原来的方向悬挂直至干燥.

干后去除圆筒的书钉(或棉线)，剪去缝线的边缘半吋，氨基酸这时沿着每张纸的左边分布为一排，转动纸，将有氨基酸的一边作为底部，以后作成一个新的圆筒，放在正丁醇、乙酸、水混合液里(展开需要10—12小时). 正好在溶剂到达纸的顶端以前，将纸筒取出，溶剂前沿标上记号，干燥.

在充分干燥之后，用茚三酮试剂(0.2%的茚三酮在水饱和的正丁醇溶液里)均匀地轻轻地喷雾(利用一个球管喷雾器). 操作在一个通风橱内进行. 喷过雾的纸在90°C加热5分钟，用软铅笔划出斑点的轮廓，注明颜色. 大多数氨基酸为紫色斑点；但苯丙氨酸、酪氨酸、天门冬氨酸为蓝色；色氨酸为橄榄褐色；天门冬酰胺、胱氨酸和半胱氨酸为褐色；脯氨酸为黄色.

结果和结论

通过测量容质和溶剂移动的比例来计算重要的斑点的Rf值(从容质的开始点算起).

从斑点的颜色和它们的Rf值(参看发表的值)以及在纸上的相对位置，我们将能够鉴定出在马铃薯提取液中的几种

氨基酸.

在结语中讨论纸上层析的原理.

参 考 文 献

Abbott, D. and R. S. Andrews. 1965. An Introduction to Chromatography. Longmans, London.

Block, R., E. L. Durrum, and G. Zweig. 1958. A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, 2nd ed. Academic Press, New York.

Bobbitt, J. M., A. E. Schwarting, and R. J. Gritter. 1968. Introduction to Chromatography. Reinhold Publ. Corp., New York.

Cassidy, H. G. 1957. Fundamentals of Chromatography. Interscience Publ., New York.

Lederer, E. and M. Lederer. 1957. Chromatography, 2nd ed. Van Nostrand, Princeton, New Jersey.

Lederer, E. and M. Lederer. 1957. Chromatography. A Review of Principles and Applications, 2nd ed. American Elsevier Co., New York.

Steward, F. C., R. H. Whetmore, J. F. Thompson, and J. P. Nitsch. 1954. A quantitative chromatographic study of nitrogenous components of shoot apices. *Amer. J. Botany* 41: 123-134.

Williams, R. J. and H. Kirby. 1948. Paper chromatography using capillary ascent. *Science* 107: 481-484.

实验 13　蛋白质的沉淀和等电点

目的

为了证明重金属和各种试剂对于在溶液中蛋白质的稳定性的影响，测定豆球蛋白的等电点.

材料

13 克豌豆种子；

50 毫升鸡蛋蛋白(2%，重量/容量)；

40 毫升 NaCl(0.4%，重量/容量)；

60 毫升 NaCl(10%，重量/容量)；

100 毫升 1%的(重量/容量)$HgCl_2$，$AgNO_3$，$MgCl_2$；

$CaSO_4$溶液；

NaOH(0.1 N)装在滴瓶内；

三氯乙酸(5%，容量/容量)装在滴瓶内；

苦味酸(饱和溶液)；

丹宁酸(10%，重量/容量)装在滴瓶内；

磷钨酸(5%，重量/容量)装在滴瓶内；

8 毫升硫酸铵(饱和溶液)；

5 克硫酸铵(固体)；

1 毫升醋酸(浓的)；

缩二脲试剂(参看书后附录)；

50 毫升柠檬酸钠(0.1 M)；

25 毫升柠檬酸(1.0 N)；

25 毫升柠檬酸(0.1 N);

25 毫升柠檬酸(0.1 N);

纱布(两层);

4 个离心管(50 毫升);

离心机;

10 个试管(最大数目/试验);

水浴器(煮沸的);

3 个烧瓶(125 毫升);

9 个烧杯(50 毫升);

pH 测定计;

9 个吸量管(10 毫升刻度);

9 个吸量管(1 毫升刻度);

数个刻度量筒(25 毫升).

步骤

A. 沉淀实验蛋白质提取液的制备

在冷却的研钵内用 40 毫升冷冻的 0.4%的 NaCl 溶液研磨 6 克干豌豆种子数分钟(其他富于蛋白质的种子亦可以利用).

用两层纱布过滤混合液，滤液在 1200×g 离心 20 分钟，按下述的实验提要使用上清液. 为了作比较，同时用 2%的鸡蛋蛋白溶液进行实验.

B. 用重金属沉淀蛋白质

在四个试管中分别吸取 3 毫升试验液. 第一个管点滴地加入 1%的 $HgCl_2$ 溶液，记下结果，然后加过量的 1%的 $HgCl_2$. 其余的三个管重复上面的步骤，但是以下列溶液的一

种代替 $HgCl_2$：1% $AgNO_3$，1% $MgCl_2$和 1% $CuSO_4$.

取 3 毫升试验溶液点滴地加 1% $CuSO_4$，当没有进一步沉淀形成的时候加 2—3 滴 0.1 N NaOH.

对于使用不同溶液记录沉淀的相对量(没有，非常微量，微量等).

观察：

C. 植物碱试剂沉淀蛋白质

分别用 3 毫升豌豆提取蛋白质和 3 毫升 2%的鸡蛋蛋白的蛋白质试验 5%的三氯乙酸，饱和的苦味酸，10%的丹宁酸和 5%的磷钨酸的作用. 点滴地加入试剂.

观察：

D. 盐析

加 2 毫升试验液到一个试管里，然后加 2 毫升饱和的硫酸铵溶液，有任何沉淀形成吗？过滤，用滤液进行缩二脲试验(参看书后附录).

含有 2 毫升试验液的第二个试管加 2 毫升饱和的硫酸铵，然后直接向管内加足够的固体硫酸铵使其成饱和溶液. 过滤，用滤液进行缩二脲试验.

2 毫升蛋白质试验液加入 2 毫升 10%的 NaCl 溶液，然后加 2—3 滴浓乙酸，过滤，用缩二脲试剂试验滤液.

观察：

E. 豆球蛋白的等电点

1．蛋白质的提取：

6 克豌豆种子用 40 毫升 10%(重量/容量）的 NaCl 研磨数分钟，将混合液转移到烧杯中，放置 15 分钟，不时地搅拌．混合液在 1000×g 离心 10 分钟，轻轻地将上清液倒进烧瓶，把烧瓶放进煮沸的水浴中加热 15 分钟，用流动的自来水使烧瓶冷却．在 1000 ×g 再一次离心提取液 10 分钟，收集上清液，用 10%的 NaCl 溶液定容到最后的体积为 50 毫升，用来作为 E-3 所指出的提取液．

2．缓冲液的制备：

在 9 个 50 毫升的烧杯中各加 2 毫升 0.1 M 的柠檬酸钠 ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)(编号 1—9)，每个烧杯加 10 毫升水，为调整每个烧杯的溶液到要求的 pH，加入下列适当量和浓度的柠檬酸溶液：烧杯 1 和 2 加足够量的 0.1N柠檬酸，使最终的 pH 分别为 7.0 和 6.5.

烧杯 3,4,5 和 6 加足够量的 0.1 N 的柠檬酸，使最终的 pH 分别为 6.0,5.5,5.0 和 4.5.

每一种溶液的最后体积用蒸馏水定容到 18 毫升，标记每种溶液的 pH，每一种缓冲液取 9 毫升分别加入相应标号的试管中，这样 9 个试管的 pH 是从高到低逐次排列的，假使需要，剩余的缓冲液可以作一个重复．

3．豆球蛋白等电点的测定：

9 种溶液分别加入精确的 1 毫升豌豆提取液，加入时经

常搅拌. 试管在室温保持20分钟,估计每一个管的混浊度,显示最大相对混浊度的溶液的pH相当于蛋白质的等电点. 假使不止一个溶液显示了相同的混浊度,在这中间要添加pH值,作为蛋白质近似的等电点.

观察:

结果和结论

作一个合适的表,说明你的关于重金属和其他试剂对溶液中蛋白质稳定性的影响的观察结果,以相对混浊度对相应的pH值,作一坐标图说明等电点实验.

在总结报告中说明,根据你们的蛋白质物理化学性质的知识评价你的结果. 对于两性离子的性质,等电点,蛋白质被重金属和另外试剂沉淀、盐析和盐溶应特别强调.

说出蛋白质所起的三个一般生物学作用:为什么蛋白质是良好的缓冲剂?你能想象出一个蛋白质在它的等电点有高的水溶性和生理活性吗?试解释.

参 考 文 献

Anson, M. L. and J. T. Edsall (Eds.) 1944-1968. Advances in Protein Chemistry. Academic Press, New York, Vols. 1-23.

Danielson, C. E. 1951. The breakdown of high molecular reserve proteins of peas during germination. *Acta Chem. Scand.* **5**: 551.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 374-385; 387-393.

Doby, G. 1965. Plant Biochemistry, rev. ed. Interscience Publ. London, New York, and Sydney.

Neurath, H. (Ed.) 1963-1966. The Proteins: Composition, Structure, and Function, 2nd ed. Academic Press, New York. Vols. I, II, III, IV, and V.

Robinson, T. 1967. The Organic Constituents of Higher Plants, 2nd ed. Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minnesota.

Stahmann, M. A. 1963. Plant Proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **14**: 137-158.

Varner, J. E. 1965. Seed development and germination. In: J. Bonner and J. E. Varner (Eds.) Plant Biochemistry. Academic Press, New York and London. pp. 763-792.

实验 14 叶绿体的色素

目的

用标准的溶剂提取和分离叶绿体色素和纸层析技术.

材料

1 克叶细胞组织(菠菜、早熟禾或另外的含叶绿素细胞组织);

100毫升乙醇(95%);

20毫升丙酮(85%);

10毫升丙酮(无水的);

50毫升乙醚;

50毫升四氯化碳;

$CaCO_3$(固体);

Na_2SO_4(无水的固体);

研钵和研杵;

分液漏斗;

铁环架和夹;

分光镜(如果有的话);

刻度量筒(小的);

2 个瓶(小的,带有合适的塞子);

有螺旋盖的品脱缸(层析箱);

层析纸(小的正方形,适合于层析箱);

支持棒(玻璃管或金属棒);

玻璃管(拉成象钢笔一样的细尖)；

纸夹；

尺；

滴管.

步骤

A. 色素提取(在弱光条件下进行)

称量大约 1 克为班上准备的绿叶组织(去掉大的叶脉)，将组织和少量 $CaCO_3$（中和细胞中的酸和防止镁从叶绿素中心移出）放在一个干净的研钵内研成细的匀浆. 为了稀释匀浆加85%的丙酮,5—6毫升是足够的,继续研磨. 用滴管将绿色上清液吸入含有 10 毫升乙醚的 250 毫升的分液漏斗内.

将组织重新提取第二次，提取的液体加到含有第一次提取液和乙醚的分液漏斗内. 在第二次提取之后，细胞组织残渣加大约等份的无水丙酮和乙醚,研磨细胞组织,如前面一样将液体转移到分液漏斗内,然后用乙醚作最后一次提取,乙醚有利于黄色素的提取. 在这次提取之后,转移透明的绿色液体到分液漏斗.

分液漏斗内的绿色溶液含有质体色素以及少量混在丙酮中的水溶性化合物. 现在加 100 毫升水到含有色素溶液的分液漏斗中，水要慢慢地加，以避免水向漏斗下流动时形成乳状液. 旋转漏斗几分钟,不能振荡,促使丙酮和另外的物质进入下面的水层.

垂直固定分液漏斗,当两个液层界限清楚的时候,放掉下面的一层并弃去它. 用水重复洗乙醚溶液三次以上，以除去全部的丙酮. 因为乙醚在水里有一定的溶解度，所以必须加 5—10 毫升乙醚以代替用水洗时丢失的乙醚，然而不能加太

多乙醚，只要在分液漏斗内有两个清楚的液体层就可以了，因为我们不希望乙醚层的体积在每次开始洗时超过 15 毫升.

在水洗过之后，将叶绿体色素溶液收集到一个小量筒里，假使必须的话，用乙醚将溶液的总体积定容到 10 毫升，如果体积多于 10 毫升，把溶液转移到一个烧杯里，让多余的乙醚蒸发掉，而使溶液保持在这个体积. 观察溶液的透射光和反射光.

将色素溶液倒进一个内含 2 克无水 Na_2SO_4 的小瓶里，用软木塞子塞紧瓶口，摇动内容物，这样盐即悬浮在溶液中，继续摇动几分钟，无水盐作为一个脱水剂而除去在乙醚中残留的水. 在盐沉淀之后，提取液就准备好用于进一步的分离技术.

B. 用纸层析分离质体色素(参看图 14-1)

制备层析箱是在一个半升大的缸里倒半吋深度的四氯化碳. 如果需要，可以利用一个较大的层析缸. 加无水硫酸钠，用一个带螺旋的盖将缸密闭.

让缸内的气体平衡一段时间. 将层析纸裁成四方形，当这张纸卷成一个圆筒的时候，它的大小要和缸相适应. 从每一张纸的底部大约 1 吋的地方划一条铅笔线，如果不立即用的话放在一个有干燥剂的地方.

将纸叠放在一个如玻璃管或金属棒的支持物上，使铅笔线保持在桌面以上.

利用一个玻璃管拉成一个如钢笔一样的细尖. 用色素提取液沿着每张纸上的铅笔线划一条大约 1 吋或半吋的线，使其干燥，重复划几次，或者直至这条线成深绿色，使色素带尽可能窄一些，并在每次供给色素之间使它干燥.

当色素干了之后，将纸卷成一个松散的有记号的一头向

下的圆筒，用一个纸夹保持其稳定，将纸筒立在底部含有四氯化碳和过量无水硫酸钠的缸内.

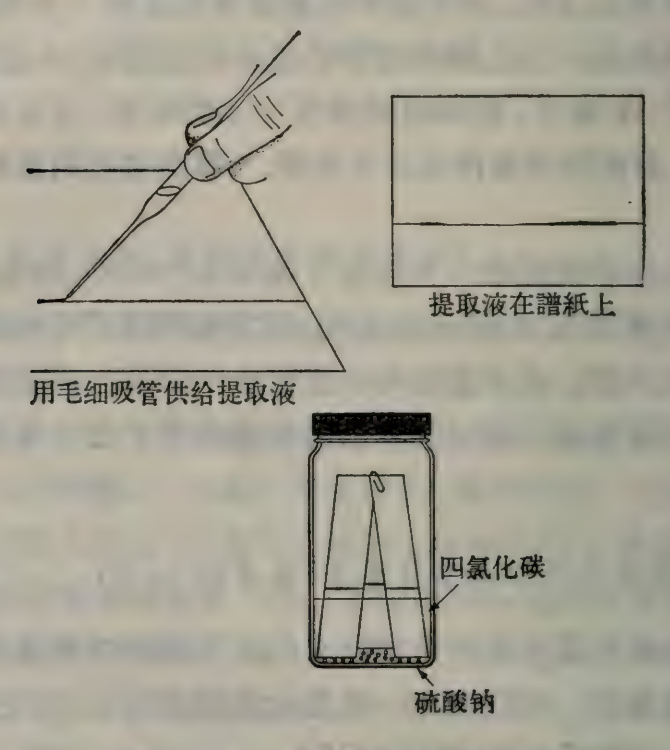


图 14-1 对于色素分离层析谱的制备

溶剂向纸的上部移动. 当溶剂接近纸的顶端时（大约1小时），取出纸谱，使其干燥.

检查刚拿出的纸，因为颜色要退掉，特别是在光下. 色素从顶端到底部显现出以下顺序的颜色带：胡萝卜素（在溶液前沿，橙黄色），叶黄素（一条或多条黄带），叶绿素 a（蓝色），叶绿素 b（黄绿）. 教师可以建议试验另外的层析溶剂. 在这种情况重复同样的步骤，以要求的溶剂代替四氯化碳. 记住用不同的层析溶剂，色素分离的状况是不同的.

结果和结论

计算在层析谱上被分离色素带的 Rf 值．在总结报告中，考虑以下问题：

1．在纸上分离色素出现的现象(层析原理)；

2．叶绿素 *a*、叶绿素 *b*、叶黄素、和类胡萝卜素的结构式以及这些色素在植物细胞内所处的位置；

3．花青素在细胞内的位置；

4．哪些色素是产生在生长在黑暗中的植物的器官里的，以及质体可能受到的颜色变化；

5．当叶绿素用强碱 (KOH 等) 处理的时候,写出硷化反应和说明溶解度的改变；

6．分清荧光和磷光．

参 考 文 献

Bonner, J. and J. E. Varner (Eds.) 1965. Plant Biochemistry. Academic Press, New York and London.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 213-236.

Galston, A. W. 1964. The Life of the Green Plant. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

Goodwin, T. 1960. Chemistry, biogenesis, and physiology of the carotenoids. In: W. Ruhland (Ed.) Encyclopedia of Plant Physiology. Springer, Berlin. 5: Part 1, 394-443.

Goodwin, T. (Ed.) 1966. Biochemistry of Chloroplasts. Academic Press, New York. Vol. I and Vol. II.

Hagen, C. W., Jr. 1959. Laboratory exercises in plant physiology for high school biology courses. *The Amer. Biol. Teacher* 21: 359-370.

Jensen, A, and O. Aasmundrud. 1963. Paper chromatographic characterization of chlorophylls. *Acta Chem. Scand.* 17: 907-912.

Lederer, E. and M. Lederer, 1957. Chromatography, 2nd ed. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton,

New Jersey.

Robinson, T. 1967. The Organic Constituents of Higher Plants, 2nd ed. Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minnesota.

Stein, W. H. and S. Moore. 1951a. Chromatography. *Sci. Amer.* 184: 35-41.

Zscheile, F. and C. Comar. 1941. Influence of preparative procedure on the purity of chlorophyll components as shown by absorption spectra *Bot. Gaz.* **102**: 463.

实验 15　叶绿素的吸收光谱和定量测定

目的

为了学习一个用于测定在叶子中叶绿素总量、叶绿素 a、叶绿素 b 以及测定从叶子提取的叶绿素的吸收光谱的技术.

材料

1 克菠菜叶(或其他新鲜叶子);
105 毫升丙酮 (80%);
研钵和研杵(可以应用匀浆器);
瓷漏斗(内有一个 Whatman No. 1 滤纸垫);
侧臂吸滤瓶;
比色杯(10毫米);
分光光度计.

步骤

A. 叶绿素的提取

在一个干净研钵内放 1 克 (鲜重) 切成小块的菠菜叶片(或其他新鲜绿叶),加 40 毫升80%(容量/容量)丙酮,把组织研成匀浆(研磨大约 3 分钟), 小心地把绿色液体转移到一个有滤纸垫的瓷漏斗内. 当过滤提取液时(抽滤),用另外 30 毫升 80%丙酮重复研磨匀浆,3—4 分钟之后, 如前一样将第二

次提取液过滤到含第一次提液的烧瓶里.

在第二次提取之后，组织就应该没有叶绿素了，假如仍提取不完全，另用一份 20 毫升 80% 丙酮重复研磨，将匀浆过滤到含有其他滤液的烧杯里. 用 10 毫升 80% 丙酮洗研钵和漏斗的边缘，以保证全部的叶绿素被收集. 为了便于计算叶绿素的量，加足够的 80% 丙酮将滤液定容到 100 毫升.

如果实验植物材料的用量可以少于 1 克（为了以后方便），就改变用于提取的 80% 丙酮的量，使最后体积依照每毫升丙酮提取 10 毫克植物材料.

B. 叶绿素的测定

将叶绿素提取液倒入 10 毫米的比色杯中，用分光光度计分别在波长645，663和652毫微米测量并记录光密度，以80% 丙酮为空白对照. 然后以每克被提取的叶组织所含叶绿素的毫克数为基础，依以下方程式计算提取液中叶绿素的量：

毫克叶绿素 a/克

$$组织=[12.7\,(D_{663})-2.69(D_{645})]\times\frac{V}{1000\times W}$$

毫克叶绿素 b/克

$$组织=[22.9(D_{645})-4.68\,(D_{663})]\times\frac{V}{1000\times W}$$

毫克总叶绿素/克

$$组织=[20.2(D_{645})+8.02(D_{663})]\times\frac{V}{1000\times W}$$

毫克总叶绿素/克

$$组织=\frac{D_{652}\times 1000}{34.5}\times\frac{V}{1000\times W}$$

在以上方程式中，D 表示在特定的波长下，叶绿素提取液

的光密度读数，V 是80％丙酮-叶绿素提取液的最终体积，W 是提取用的组织的鲜重克数．

计算和叶绿素测定：

C．在80％丙酮中叶绿素的吸收光谱

用足够的 80％丙酮稀释一部分在上面所用的提取液，使透光度约在 30—35％，以另一个装满 80％丙酮的比色杯作空白对照．

在 350—700 毫微米范围内，20毫微米为间隔测定并记录稀释叶绿素提取液的光密度读数，在最大吸收的部位，以 5 毫微米为间隔增加读数．此外，叶绿素提取液的可见光吸收的观察，也可以用一个手持分光镜来进行（如果有的话）．

光密度读数：

结果和结论

现在计算每克叶子提取的叶绿素毫克数的量．同样，包括了一个说明叶绿素吸收光谱的图表，在这个图表中以光密度读数为纵坐标，以波长为横坐标．

在总结报告中，考虑一下分光光度测量中利用 80％丙酮作为提取介质和空白试剂的理由．在计算叶绿素量的方程式中所用的吸收系数的重要性是什么？为什么光密度读数要在 645，，663和 652 毫微米进行？在这个实验中所用的叶绿素的

测定方法容易有误差吗？试解释.

当联系到天然产物的鉴定时，吸收光谱的重要性是什么？吸收光谱和作用光谱之间的差异是什么？如何利用它们得到在植物中光调节反应的见解？

参 考 文 献

Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*. **24**: 1-15.

Arnon, D. I. 1956. Photosynthesis by isolated chloroplasts. IV. General concept and comparison of three photochemical reactions. *Biochem. Biophys. Acta*. **20**: 449-461.

Bonner, J. and J. E. Varner (Eds.) 1965. Plant Biochemistry. Academic Press, New York and London.

Bray, J. R. 1960. The chlorophyll content of some native and managed plant communities in central Minnesota. *Can. J. Botany* **38**: 313-333.

Bruinsma, J. 1961. A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochem. Biophys. Acta* **52**:576-578.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 218-223.

Galston, A. W. 1964. The Life of the Green Plant. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

Koski, V. 1950. Chlorophyll formation in seedlings of *Zea mays* L. *Arch. Biochem. Biophys*. **29**: 339-343.

MacKinney, G. 1938. Some absorption spectra of leaf extracts. *Plant Physiol*. **13**: 128-140.

MacKinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *Biol. Chem*. **140**: 315-322.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 179-182.

Steward, F. C. 1964. Plants at Work. Addison-Wesley, Reading, Massachusetts.

实验 16　番茄红素的分离和鉴定

目的

成熟番茄果肉的主要色素是类胡萝卜素，大部分是番茄红素．在这个试验中，你将用柱型层析法分离这种色素，番茄红素可用吸收光谱鉴定．

材料

番茄(成熟的)；
150 毫升丙酮；
300 毫升苯；
5 毫升无水酒精；
50 毫升酒精(95%)；
Na_2SO_4(无水固体)；
$CaCO_3$(烘干的无水固体)；
Al_2O_3(经过烘干的)；
组织捣碎机；
烧杯(500毫升)；
Whatman No. 1 圆形滤纸(适合于瓷漏斗和分离柱)；
瓷漏斗及吸滤瓶；
分液漏斗(500 毫升)；
蒸发器(见图 16-1 A)；
移液管(巴斯德，有橡皮吸球的或任意使用的)；
柱型层析装置(见图 16-1 B)；

棉花；

填塞棒(制柱用)；

3个蒸发皿；

比色杯；

分光光度计。

步骤

A. 番茄红素的提取

半个成熟了的番茄在组织捣碎机中匀浆化（去除腐败了的斑点及绿茎）. 加入含有一小撮 $CaCO_3$ 的丙酮 100 毫升和苯 100 毫升后再继续搀和数分钟. 将匀浆倒入一个 500 毫升的烧杯中，并让它沉淀.

铺一张 Whatman No. 1 滤纸在瓷漏斗中，用 500 毫升的抽滤瓶将匀浆抽滤. 在所有溶液过滤完毕后再加入果肉，这样可过滤得快些.

加压并用数毫升丙酮洗果肉多次，直到干燥并几乎没有颜色. 但洗的丙酮用量不要超过 50 毫升. 去掉果肉，留下过滤液.

过滤液将有二层. 在过滤液中加入200毫升的水，慢慢地旋动使水和下层溶液混合. 将全部混合溶液倒入一个 500 毫升的分液漏斗，将底部淡黄色的水-丙酮溶液放去.

用 100 毫升水多次洗上层苯溶液(橘红色)，直到水层中毫无丙酮溶液. 一般洗二或三次，这和过滤时用的丙酮量有关. 洗的过程中只能旋动而不能摇动，否则形成乳状液后沉淀费时.

将苯溶液倒入一个有塞子和管子的 150 毫升三角烧瓶中(图16-1A)，溶液在30—35°C水浴上加热并用水泵抽走空气，

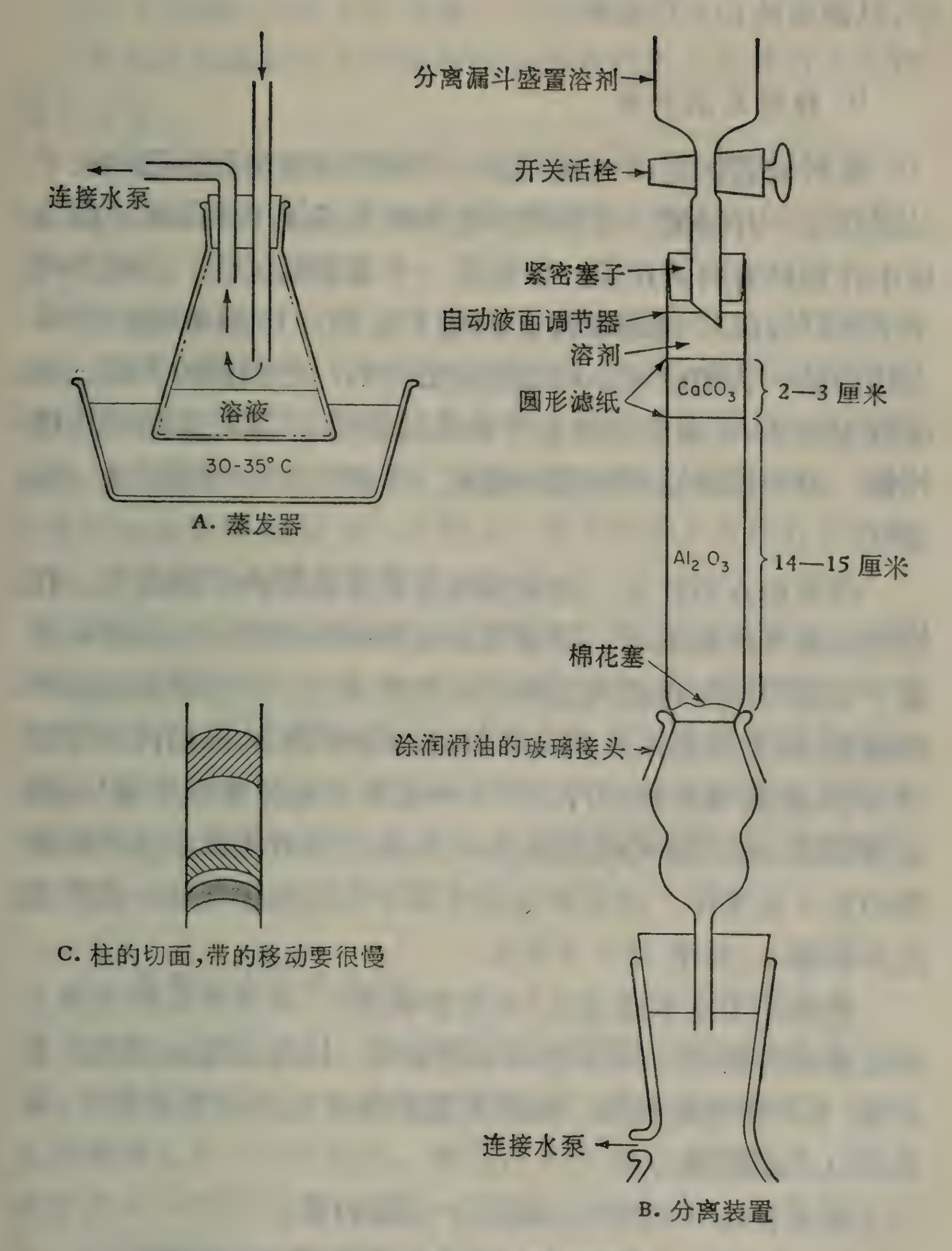


图 16-1　提取番茄红素的装置

苯很快蒸发掉．不要使溶液过分浓缩或有结晶析出，否则很难再溶解．另一方面如果溶液过稀，以后会分离得不好。

溶液浓缩后加入少量无水硫酸钠使其干燥，贮存于冰箱

中，以避免热和光引起氧化.

B. 柱状色层分离

层析装置如图16-1 B．放一个底部有棉塞的合适的柱于抽滤瓶上，并抽滤．分别将少量的预先经过干燥的矾土倒入柱中并旋转舂将其压紧．装柱是一个重要的过程，否则带将不平难以分离．继续装柱直到矾土有 14—15 厘米深．在矾土顶部放一块和柱大小相同的滤纸使有一个明显的界限．在滤纸上放 2—3 厘米的预先干燥的碳酸钙，不要将碳酸钙压得过紧，否则就会妨碍溶液的流通．在整个柱的顶端再放一张滤纸.

将苯加入到柱中，抽滤使柱更紧并去除内贮的空气．在柱完全被苯所润湿后，用滴管加入浓缩的溶液，小心必须使整个上表面同时覆盖而且保持它的覆盖．一次不能加入过多的溶液，因为溶剂蒸发后色素将沉淀在柱壁上，以后纯苯将受到污染，分离将不好进行．所有的色素不能从管壁中漏出，而必须从顶上滤纸中心引出．加入足够的溶液使矾土上的色素带约有 1 厘米厚．然后加入无水苯并在柱的顶端加一含有苯的分液漏斗，如图 16-1 B 所示.

慢慢使无水苯透过柱(每次加数滴)，必须使沉积在壁上的色素全部被第一部分的纯苯所溶解．柱的顶端必须经常盖有苯，并不停息地抽滤．如果有紧的塞子适当地装在柱上，漏斗可以自动供液.

色素将按下列次序分成五个主要的带：

1．黄色带(含有 α 及 β 胡萝卜素将被洗入瓶中)；

2．橘红色带(在带 3 之下慢慢分开)；

3．宽的红色带(它的下部很易和带 2 渗混)；

4．红色带(接近顶端)；

5. 棕色带(在矾土的顶端).

开始时在碳酸钙上可能有狭小的黄色带，它将被洗下和带 5 合併.

继续分离直到带 2 和带 3 清楚地分开. 分离大约需用 180 毫升苯,不要超过 1 小时. 如果过程太慢，在 100 毫升干苯中加入 2 滴无水酒精.

当带 2 和带 3 明显分开后,让柱再抽滤半分钟,然后很快将柱取下. 将矾土柱弄出来放在纸上，小心地用小铲将色素带分别取出. 带 3 是番茄红素，带 2 和带 4 是番茄红素的异构体. 只要带 3 的上部因为下部被带 2 的成分所污染，必须记住柱的切面常如图 16-1 C 所示. 带 2 和带 4 有良好的吸收曲线,可以留作和番茄红素比较.

将矾土带分别放在小烧杯或蒸发皿中,泡在乙醇里,搅拌并将溶液用滤纸过滤到一个小烧瓶或瓶中. 如果色素没有完全洗下,可以再加酒精重复洗,但应避免用过量酒精以致溶液太稀. 在酒精洗脱液中加 20—30 毫升的苯,放入到分液漏斗中,酒精用水重复洗去. 苯用无水硫酸钠干燥. 如果需要贮藏,可以放在冰箱内.

C. 番茄红素的吸收带

应用分光光度计之前必须先熟悉仪器及操作说明书. 在一个比色杯中倒入纯苯作为溶剂空白以使仪器标准化，将色素溶液倒入另一个比色杯. 测量在 470 毫微米的吸收. 透过率应在 30—50%之间,但是一定不能少于 10%. 如果溶液太浓,加苯稀释到适宜的范围.

测定 420—520 毫微米的吸收. 最好从 420 毫微米开始，每隔 4 毫微米作读数直到包括全区. 寻找光密度最高(透过最低)处,然后在靠近最高处每毫微米进行读数寻出吸收高峰.

番茄红素有3个光密度高峰，一个在455毫微米附近，一个在470毫微米附近，一个恰在500毫微米处。

结果和结论

用每一个光密度的读数画吸收光谱，以坐标表示光密度值，对着横坐标上的有关波长画曲线。

将你所得到的番茄红素的曲线和发表的相比较（见Karrer和Jucker的类胡萝卜素）。乙醇、苯和乙烷的溶液得到具有接近相同高峰的同样曲线。

参考文献

Bonner, J. 1965. The Isoprenoids. In: J. Bonner and J. E. Varner (Eds.) Plant Biochemistry. Academic Press, New York and London.

Cassidy, H. G. 1957. Fundamentals of Chromatography. Interscience Publ., Inc., New York.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 223-227.

Doby, G. 1965. Plant Biochemistry, Rev. ed. Interscience Publ., New York and Sydney.

Goodwin, T. 1960. Chemistry, biogenesis and physiology of the carotenoids. In: W. Ruhland (Ed.) Encyclopedia of Plant Physiology. Springer, Berlin. 5: Part 1,394-443.

Goodwin, T. W. 1961. Biosynthesis and function of carotenoids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 12: 219-244.

Karrer, P. and E. Jucker. 1950. Carotenoids. Elsevier Publ. Co., New York.

MacKinney, G. 1935. Leaf carotenes. *J. Biol. Chem.* 111: 75-84.

Porter, J. W. and D. G. Anderson. 1967. Biosynthesis of carotenes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 18: 197-228.

Tomes, M. L., F. W. Quackenbush, and T. E. Kargl. 1956. Action of the β gene in the biosynthesis of carotene in the tomato. *Bot. Gaz.* 117: 248-253.

Zscheile, F., J. White, B. Beadle, and J. Roach. 1942. The preparation and absorption spectra of five pure carotenoid pigments. *Plant Physiol.* 17: 331-346.

实验 17　不同成熟期花中的花青素

目的

用纸和（或）薄膜层析提取和分离花青素；观察在成熟期间花瓣中不同花青素衍生物的产生.

材料

凤仙花(*Impatiens balsamina* L.) 三个不同成熟期各取花蕾 4—5 个（如果没有，可采用其它含有花青素植物组织以达到比较的目的）；

10 毫升 HCl（1%[容量/容量]在 95%的酒精中）；

300 毫升溶液 I（叔丁醇:乙酸:水；3:1:1）；

300 毫升溶液 II（10%[容量/容量]乙酸在水中）；

300 毫升溶液 III（正丁醇:乙酸:水；5:1:4）；

NH_4OH(浓的)；

$AlCl_3$ 喷雾剂(见书后附录)；

喷雾器及瓶(或其它喷雾装置)；

解剖刀或刀片；

研钵及杵；

玻璃丝、玻璃漏斗；

蒸发装置(见图 16-1 A)；

微量移液管(或有刻度的玻璃管)；

纸上层析装置(纸、钉书机、书钉、层析台、有盖层析缸、尺、油脂)；

紫外光灯光源；

薄膜层析装置(玻璃板、挟玻璃板的夹子、展开器、方形层析缸和盖子、纤维素、硅胶 H)；

通风橱(层析谱的干燥和喷雾用)。

步骤

A. 从不同成熟期花瓣中提取花青素的衍生物

从温室中生长的凤仙花上采三个不同成熟期的花蕾 4—5 个。

第一期：花蕾尚未张开，在花瓣上只有很淡的颜色；

第二期：花蕾尚未张开，但看上去已很饱满，在花瓣上出现颜色；

第三期：深色的、新鲜的、完全开放的花。

分别用少量的含 1% HCl 的 95% 酒精 (2—3 毫升) 去磨研提取第一、第二期的花蕾和第三期的花瓣。每一种匀浆经过玻璃丝过滤并浓缩接近干燥或到沉淀开始形成。滤过物可以立即应用或贮存在冰箱中，主要用于纸上或薄膜层析。

下列的基本技术提要，可以根据使用的设备和实验室教师的决定而加以改变。例如从别的植物组织提取花青素可以用不同的色层溶剂。如果市上的层析箱不适用，可以任意用一升容积左右的瓶子或更小的有螺丝盖的瓶子。另外，如果双向的纸上层析不能实现，那么所有提取液可以在一张纸上用 10%乙酸作上升的色层。

B. 纸上层析(两向的)

放一大张 Whatman No. 1 滤纸在干净的书桌上。在底部 4 吋左边 2 吋处用铅笔画一个小的“×”。用一个有刻度的

移液管吸取第一期的提取液，放一滴在铅笔画的记号上．点的大小不能大于 5—6 毫米，在进行第二次之前让其完全干燥．在“×”记号上点 10—20 次或直到斑点已足够“大量”时．在每两次点样之间一定不能少于一分钟，让液体有干燥的机会．

用另外的纸重复对其它剩下的两种提取物(第二和三期)进行操作．

当所有提取物都点完后，将纸放入层析箱（点在上端）同叔丁醇-乙醇-水（3:1:1）溶液系统作下降层析．当色层跑完后(约需 12 小时)，将纸悬挂在空气中干燥，有原始点的一边在下面，同时在溶液的前沿作记号．

当纸干燥后(大约一小时)，在日光下和紫外光下观察分离后的成份（小心！不要直接看灯）用铅笔在每一个中心点一个点．确定和记下每一个成分的 Rf 值，记下在可见光成紫外光下荧光的颜色．

第二向纸的位置是这样的，第一向的原点（铅笔记的“×”)在极右面，溶液的前沿在左边，和分开的成份的线垂直．然后将纸卷起来（点在底部和纸筒的外面)，将边缘钉住．将纸筒立在盛有溶液(10%乙酸）的瓶中，溶液刚好湿到在前面分离的各成份的下面．

在 10%乙酸溶液中展开的时间在 1½到 2 小时之间．当溶液的前沿接近纸的顶端 1—2 吋时将纸从瓶内取出，悬挂着干燥．

将干燥的纸在可见光和紫外光下进行观察，记下有颜色的或有荧光的成份，如前所述．将纸放在有浓氨的瓶或烧瓶口上，不同的点都将清楚地显示出来．如果需要可以喷 2% $AlCl_3$ 的溶液．干燥后再在可见或短波长的紫外光下观察．

C. 薄膜层析

1. 薄板的制备:

制备含有纤维-硅凝胶 H 混合的浆液(10 克纤维素、4 克硅凝胶 H 和 80 毫升的水搅拌,足够做 5 个 20×20 厘米的薄板)。当水浆混合均匀后,用展开器制备薄板,纤维凝胶层的厚度约为 250 微米,展开后将薄板平放在一个光滑的表面上,顶端在其上轻轻地敲几次,薄板做好后在 40°C的恒温箱中过夜。

当用交替的方法,薄板可以用约为一份吸附剂-2 和一份水组成的匀浆制备(但这凝胶层不能用前述的介质得到同样结果),如果用硅胶(吸附剂-2)薄板需要在 110—120°C的烘箱中活化 30—35 分钟。从烘箱中取出薄板后放在一个干燥器中冷却到室温即可应用。

2. 点样和展开:

将第一期的提取液 3—6 微升在距底部 1 吋和距左边 1 吋小心地点一个点。在同一条线上在右边点同样量的第二期提取液,最右边点第三期的提取液。不同时期的须在一个薄板上,在同样的始点上点三个明显的点。

薄板在溶剂Ⅲ(正丁醇-乙酸-水溶剂(5:1:4)中展开。把足够的溶剂倒入一个方形的层析缸中深度大约距底部½吋。将点好的薄板用支架垂直放在层析缸中,那些点正好在溶剂的平面上。将层析缸用合适的涂油脂的盖子盖上,薄板展开 1—2 小时当溶剂的前沿到达距顶点 1 吋时,即将薄板取出干燥。

每一期的原始样品混合液应变成几个清楚的点。在可见光和短波的紫外光下观察标记不同的成份(小心!保护自己的眼睛)。如果有必要,可以用一个干净的薄板盖在层析谱上作

为永久的记录，然后重叠并描出分开不同的成份．同时计算Rf值，并注意在花青素衍生物的数目和花发育的时期之间的相互关系．

如果需要回收色素可以从薄板上将吸附物取下放在烧杯中，用1% HCl的甲醇洗脱，用玻璃丝过滤或离心，收集含有色素的洗脱液．如果需要，可以测定分离的色素的吸收光谱．

结果和结论

设计和作一个适合的图解说明以上不同时期花蕾的花青素的衍生物．如果用表来说明，一定要包括应用的层析的方法、溶液系统、每一种提取液分离成份的数目和它们的Rf值．这些成份在可见光下是否有明显的颜色或者在短波长的紫外光下有荧光．为了进一步说明结果可将复描出的色层谱附上。

虽然不同分离的成份没有得到正面的结果，但三个时期所得到的红色或紫外光的荧光点样本的数目可以作为凤仙花发育的色素变化的证据。你的结束语必须同时考虑色素形成的变化及用纸和薄膜层析分离那些成份有关的基本原理（如果前面的实验没有考虑过）．

参 考 文 献

Abe, Y. and K. Gotoh. 1959. Biochemical and genetic studies on anthocyanins in eggplant. *Bot. Mag. Tokyo* 72: 434-437.

Alston, R. E. and C. W. Hagen, Jr. 1958. Chemical aspects of the inheritance of flower color in *Impatiens balsamina* L. *Genetics* **43**: 35-47.

Clevenger, S. 1964. Flower pigments. *Sci. Amer.* **210** (6): 84-92.

Dayton, T. O. 1956. The inheritance of flower color pigments. I. The genus Antirrhinum. J. Genetics 54: 249-260.

Geissman, F. A. 1956. Inheritance in the carnation *Dianthus caryophyllis* V. The chemistry of flower color variation, II. *Genetics*

41: 93-97.

Goodwin, T. W. (Ed.) 1965. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Academic Press, London and New York.

Hagen, C. W., Jr. 1959. Influence of genes controlling flower color on relative quantities of anthocyanins and flavonols in petals of Impatiens balsamina. *Genetics* **44**: 787-793.

Hagen, C. W., Jr. 1966a. The differentiation of pigmentation in flower parts. I. The flavonoid pigments of Impatiens balsamina, genotype 11HHP~P~, and their distribution within the plant. *Amer. J. Bot.* **53**: 46-54.

Hagen, C. W., Jr. 1966b. The differentiation of pigmentation in flower parts. II. Changes in pigments during development of buds in *Impatiens balsamina*, genotype 11HHP~P~. *Amer. J. Bot.* **53**: 54-60.

Harborne, J. B. 1958. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem. J.* **70**: 22-28.

Harborne, J. B. 1959. Chromatographic identification of anthocyanin pigments. *Chromat. Rev.* **1**: 209-224.

Lawrence, W. J. C. and R. Scott-Mancrieff. 1935. The genetics and chemistry of flower color in *Dahlia*: A new theory of specific pigmentation. *Genetics* **30**: 155-226.

Mansell, R. L. and C. W. Hagen, Jr. 1966. The differentiation of pigmentation in flower parts. III. Metabolism of some exogenous anthocyanins by detached petals of *Impatiens balsamina. Amer. J. Bot.* **53**:875-882.

Miles, C. D. and C. W. Hagen, Jr. 1968. The differentiation of pigmentation in flower parts. IV. Flavonoid elaborating enzymes from petals of *Impatiens balsamina. Plant Physiol.* **43**:1347-1354.

Newman, D. W. (Ed.) 1964. Instrumental Methods of Experimental Biology. Macmillan Co., New York.

Simmonds, W. W. 1960. Flower color in *Lochnera rosea. Heredity* **14**:253-261.

Turner, N. A. and R. J. Redgwell. 1966. A mixed layer for separation of amino acids by thin-layer chromatography. *J. Chromatography* **21**:129-132.

实验 18 细胞壁物质

目的

用染色方法和显微镜观察研究不同细胞壁的组成成份.

材料

(所有试剂，需用量少，分别放入滴瓶中)：

番茄或槭(幼茎)；

棉花；

旱金莲种子(分为几个部分：干种子、浸在水中几小时的种子、萌发 48 小时的种子)；

芦荟(*Aloe*)或君子兰(*Clivia*)叶子；

老鹳草茎；

I_2KI 试剂(见书后附录)；

H_2SO_4(60%，容量/容量)；

铜氨液试剂(见书后附录)；

钌红溶液(见书后附录)；

间苯三酚醇溶液(1 克间苯三酚溶于 100 毫升 95% 乙醇中)；

苏丹Ⅲ试剂(见书后附录)；

HCl(12%，容量/容量)；

HCl(浓的)；

载片和盖片；

显微镜；

滤纸.

步骤

A. 纤维素的鉴定

1. 幼茎横切面:

将番茄或蓖幼茎的横切片放在有一滴 I_2KI 溶液的载片上. 一分钟后用一片滤纸吸去 I_2KI, 并在切片上加一滴 60% (容量/容量)硫酸, 盖上盖片并立即进行显微镜观察. 纤维素结构应当吸涨并染上蓝色. 绘出所观察到的切片图, 并指明由大部分纤维素所组成的那些组织.

观察:

2. 在植物细胞壁中纤维素的结构:

将几根棉花毛放在有一滴 I_2KI 试剂的载片上, 一分钟后,用一片滤纸吸去 I_2KI,并盖上盖片.

在盖片的边上加一滴 60% 硫酸,并用显微镜观察纤维的活动情况. 注意在膨胀的过程中发生螺旋式的运动. 然后把盖片往下压, 一直到把吸涨的纤维压平为止. 观察并绘一略图来说明构成细胞壁的纤维素原纤维.

载片上放几根棉花毛,盖上盖片,并在盖片边上加一滴铜氨液. 注意纤维强烈的螺旋式运动和穗头一样的吸涨, 纤维素很快被新鲜的铜氨液所溶解, 但果胶化合物在这个试剂中不溶解. 指出果胶化合物在棉花毛的壁中的位置.

观察:

B. 果胶化合物的鉴定

放几片旱金莲种子(在水中浸几小时)内胚乳的薄横切片在一个有稀钌红溶液的小皿中．大约 20 分钟后(如果染色无鲜明的差别，可以延长时间)拿出一个切片，放在有一滴水或者甘油的载片上．用中倍和高倍的显微镜检查切片．果胶化合物染成红色，而其他两种化合物不染色或者轻度染色．画两个相邻细胞同时指出果胶化合物的位置．

以同样的方法用钌红溶液染幼小番茄茎的薄横切片．在中倍和高倍显微镜下检查厚角组织细胞中果胶化合物的存在．说明果胶化合物在厚角组织细胞壁的什么地方，注意切片的其他组织是否显示了果胶化合物的存在．

观察：

C. 半纤维素的鉴定

将浸湿的旱金莲种子胚乳的薄横切片放在有一滴水的载片上，用显微镜进行观察．注意细胞壁不规则的变厚．

将另一胚乳切片放在有一滴 12% HCl 的载片上，在显微镜中等倍数下观察，并注意细胞壁的厚度．载片放在火焰上加温几分钟后再观察．半纤维素被热的稀无机酸所水解，而真正的纤维素能抵抗这种处理．

将萌发的旱金莲种子胚乳薄的横切片也按上述方法进行，并与没有萌发的种子相比较．

观察：

D. 木质的鉴定

将番茄和向日葵茎的薄的横切片放在载片上，加一滴间苯三酚醇溶液，让溶液蒸发，然后加一滴浓 HCl，在切片上盖上盖片，木质化的组织染成樱桃红颜色。指出在茎中什么组织被木质化了。

观察：

E. 角质的鉴定

把芦荟或君子兰叶子薄的横切片放在盛有苏丹Ⅲ溶液的小碟子中，15—20 分钟后取出切片，在蒸馏水中好好洗净，放在有一滴水的载片上，在显微镜中等倍数下观察切片，角质染成橘红色。绘所观察到的切片情况并指出被染色的角质的位置。

观察：

F. 木栓质的鉴定

把老鹳草茎的薄的切片放在盛有苏丹Ⅲ的小碟中，15—

20 分钟后取出切片，在水中好好洗净，放在有一滴水的载片上，在显微镜中等倍数下观察染色切片，木栓质象角质一样染成橘红色．绘图指明在这个切片上木栓质存在于细胞壁的何处．

观察：

结果和结论

提出一个有标识的草图和(或)一个简明报告来说明结果．

在总结报告中要考虑到所研究的细胞壁化合物的化学结构和进行实验的一般根据．

回答以下问题作为对你所获得结果进行说明的指导：

1．在茎中，什么组织是由大量的纤维素所组成？

2．什么组织没有表现出纤维素的存在？

3．假如用 I_2KI 试剂不能查出纤维素，是否意味着纤维素不存在？说明之．

4．在铜氨液试剂试验的基础上，为什么能推论果胶化合物在棉花毛的壁中的分布？

5．在旱金莲胚乳的细胞壁中，果胶化合物位于何处？

6．在番茄幼茎的厚角组织以外的其他组织的细胞壁中有果胶质吗？

7．在种子萌发时，半纤维素在胚乳细胞壁中发生了什么变化？关于半纤维素的作用能够提出些什么？

8．木质化的生理意义是什么？

9．木栓化的细胞怎样区别于角质化的细胞？含有角质和木栓质的细胞壁有什么生理意义？

10．通常用什么术语来表示木栓化的细胞？

参 考 文 献

Brown, S. A. 1966. Lignins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 17:223-244.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 4-9.

Frey-Wyssling, A. 1954. The fine structure of cellulose microfibrils. *Science* 119:80-82.

Frey-Wyssling, A. and K. Mühlethaler. 1965. Ultrastructural Plant Cytology. Elsevier Publ. Co., Amsterdam.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 30-35.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and L. A. Swanson. 1955. Laboratory Plant Physiology, 3rd ed. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 138-140.

Mühlethaler, K. 1967. Ultrastructure and formations of plant cell walls. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 18:1-24.

Robinson, T. 1967. The Organic Constituents of Higher Plants, 2nd ed. Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minnesota.

实验 19 扩散作用

目的

研究扩散过程及影响这个现象的一些因素.

材料

HCl(浓的,放在滴瓶中);

NH_4OH(浓的,放在滴瓶中);

NaOH(0.1 N,放在滴瓶中);

50 毫升甲基红溶液(见书后附录);

10 毫升氯仿;

10 毫升曙红溶液 (1%,重量/容量);

5 毫升甲苯;

5 毫升乙醚;

200 毫升淀粉溶液(2%,重量/容积);

200 毫升 I_2KI 溶液(见书后附录);

两份水(每份 500 毫升,在不同温度下:5—10°C,25°C);

玻璃管(盛有凝固的细菌-琼脂的凝胶和甲基红,它用 NaOH 调到碱性颜色,制备见方法 B 部分和图 19-1);

玻璃管(装有一片滤纸,用调整到碱性颜色的甲基红指示剂润湿. 制备见方法 B 部分和图 19-1);

2 个小的瓶或缸(塞上一个打孔的塞子,并装上浓 HCl,见图 19-1);

玻璃管(直径½吋,长 16 吋);

4 个铁环架和夹子;

棉花;

2 个试管;

6 个透析管(长 7 吋,浸在水中);

12 个螺旋夹;

3 个塑料盘(7×4 吋).

步骤

A. 气体的简单扩散

用两个铁环架和夹子把玻璃管(大约直径为½吋，长 16 吋)水平地支在实验桌上,管的两端用棉花塞住.

开始实验时,拔下塞子. 在一个塞子上放3—5滴浓 HCl,在另一塞子上放 3—5 滴浓 NH_4OH. 酸或碱从管的末端进入管中。一定要同时把塞子放在管的两端.

注意在管中出现狭窄白环的时间. 在观察到环时立即记下环的位置并测量环与两端的距离. 重复试验几次。在每次进行试验前一定要洗管子并完全干燥.

环与管两端距离的测量:

指出在管中进行扩散的特殊气体并写一平衡式来说明在环的形成中所进行的反应:

根据下式计算所见气体的相对扩散速率和轻的气体扩散

比重的气体快多少：

$$相对扩散速率=\frac{扩散快的气体移动距离}{扩散慢的气体移动距离}$$

现在根据下式来比较所见气体的相对密度，它与相对扩散速率呈反相关：

$$\frac{扩散快的气体的速率}{扩散慢的气体的速率}=\frac{\dfrac{1}{\sqrt{\dfrac{轻的气体（分子量）}{2}}}}{\dfrac{1}{\sqrt{\dfrac{重的气体（分子量）}{2}}}}$$

$$=\frac{\sqrt{\dfrac{重的气体（分子量）}{2}}}{\sqrt{\dfrac{轻的气体（分子量）}{2}}}$$

按照以上公式〔根据格雷厄姆（Graham）扩散定律〕所得到的值将能表示出轻的气体扩散比重的气体快多少。你所得到的实验结果符合于格雷厄姆定律吗？

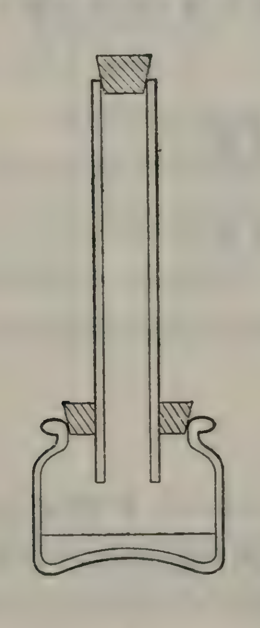
B. 通过气体和液体介质进行扩散的比较速率

加 2 克细菌-琼脂到 70 毫升水中，熔化琼脂，加 10 毫升甲基红指示剂（见书后附录），并加足够滴数的 0.1 N NaOH，

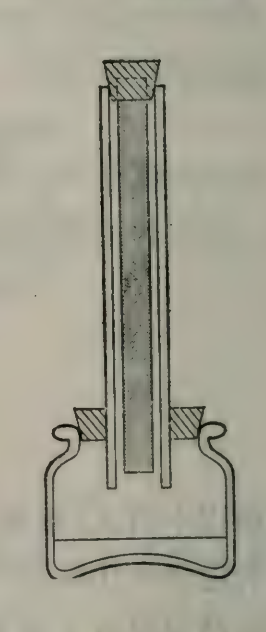
调整指示剂至黄色或它的碱性颜色．然后用热水使熔化的琼脂混合物的体积达到 100 毫升，用熔化的琼脂混合物装满玻璃管(大约直径为 1 厘米，长 10 厘米，底部塞住)．

当琼脂凝固在管上时，用铁环架和夹子支持管子，并使管的开口朝下放在盛有浓 HCl 的小瓶中（图 19-1）．在适当的时间间隔测量至扩散前沿的距离，并记录扩散速率（毫米/小时）．由于琼脂对溶质的扩散没有什么显著的阻滞，因此可以假定此扩散介质与水溶液相接近．

如图19-1所示，切下一条滤纸(直径略小于1厘米，长略短于10厘米)并浸在甲基红指示剂中(母液用少许 0.1 N NaOH 调整至黄色)，把湿的滤纸悬浮在第二管里(直径 1 厘米，长10厘米)，把管放在盛有 HCl 的小瓶中．



A
管装满用甲基红着色的琼脂凝胶



B
管装上用甲基红指示剂浸湿的滤纸条

图 19-1　通过气体和液体介质进行扩散的比较速率

记录 HCl 通过气体介质进行扩散的速率(毫米/时)．

观察：

C. 液体扩散

在试管中放5毫升氯仿，在氯仿上面慢慢加足够量的水(用曙红着色)，一直到有色层深达5毫米．然后小心加5毫升乙醚，并用塞子把试管塞紧，不要摇动试管．

第二个试管按同样方法进行，但是用二甲苯代替乙醚作为上层溶液．

仔细标记每个管液层之间的界面，并把管放在一边，注意避免震动．在一周内观察试管几次，并记录界面位置变化(曙红-水层部位的变化)．

观察：

D. 溶质扩散

选用一个透析管（长大约7吋)，它预先浸在水中．一端扭紧，向后弯并用螺旋夹把它紧紧夹住．另一端用手指搓开，装淀粉溶液至管顶1吋之内．这开启的一端按另一端的方式一样把它夹好．一定要夹紧不能有漏洞．洗掉管外表面任何淀粉．把管子沿着塑料盘(7×4吋)的长边放入，加5—10°C水(用冷藏水或用冰冷冻的水)一直到水刚好盖住管子．

选用另一个透析管，装满 I_2KI 溶液，用夹子夹住两端，把这个管子放入水盘中，但是沿着盘子的相对的另一边放下．

不要让管子彼此接触．假如有漏洞就会立即发现，应当纠正．

按照以上方法做另一个盘子，但是水温应当是25°C左右．

在各种情况下要记录两管放入水中的时间，在以后二个多小时要经常观察管中和盘子的水中的颜色和体积的变化．

观察：

结果和结论

根据你的观察，用图表来表示各部分结果．按照实际情况指出什么分子进行扩散，扩散的方向和扩散通过的介质性质．

在总结报告中回答以下问题：

1．叙述和说明应用于气体扩散的格雷厄姆扩散定律．

2．什么是菲克(Fick)扩散定律，如何把它应用于控制溶质扩散的那些因子？

3．说明"扩散系数"．

4．思考影响气体、溶质扩散速率的那些因素以及在这个实验的不同部分中是否已经证明了某些因子的影响．

参 考 文 献

Bull, H. B. 1964. An Introduction to Physical Biochemistry. F A. Davis Co., Philadelphia.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York, pp. 41-47.

Edsall, J. T. and J. Wyman. 1958. Biophysical Chemistry. Academic Press, New York and London. Vol. I.

Giese, A. C. 1968. Cell Physiology, 3rd ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia, London, and Toronto.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 44-53.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and C. A. Swanson. 1955. Laboratory Plant Physiology, 3rd ed. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey.

Sutcliffe, J. 1968. Plants and Water. St. Martin's Press, New York.

实验 20　膜和透性

目的

为了研究一些人工膜系统和活组织对酸、碱、不同离子及有机物质的透性.

材料

紫万年青叶子；
甜菜根(花瓣、红甘蓝或含有花青素的倒挂金钟的叶子)；
紫鸭跖草或红洋葱的叶子；
100 毫升硅酸钠溶液($Na_2Si_4O_4$,比重 1.2)；
25 毫升亚铁氰化钾溶液(5%,重量/容量)；
硝酸钴结晶[$Co(NO_3)_2 \cdot H_2O$]；
硫酸镍结晶($NiSO_4 \cdot 7H_2O$)；
硫酸铜结晶($CuSO_4$)；
10 毫升 KOH(0.025 N)；
10 毫升 NH_4OH(0.025 N)；
10 毫升 HCl(0.025 N)；
10 毫升醋酸(0.025 N)；
50 毫升 NaCl(4%,重量/容量)；
50 毫升 $CaCl_2$(0.2%,重量/容量)；
20 毫升甘油(1.0 M)；
20 毫升葡萄糖(1.0 M)；
20 毫升叔丁醇(1.0 M)；

20 毫升乙二醇(1.0 M)；

20 毫升甲醇(1.0 M)；

2 个试管；

5 个表玻璃；

5 个烧杯(80 毫升)；

载片和盖片；

显微镜；

放大镜.

步骤

A. 人工膜

用硅酸钠(水玻璃，$Na_2Si_4O_4$,比重 1.2) 水溶液把两个试管装满一半. 很快地把一小颗硝酸钴 [$Co(NO_3)_2 \cdot H_2O$] 结晶浸入水中 (这样气泡就不会粘着它)，然后把它滴入一个盛硅酸钠的试管中.

按照这个方法用一颗硫酸镍 ($NiSO_4 \cdot 7H_2O$)结晶重复进行，几乎马上就形成了不溶的硅酸钴和硅酸镍.

用放大镜观察每个试管中大的细丝的顶部，并注意它们伸长的方式. 假如在细丝的顶部有气泡，用搅棒把它赶掉。

观察：

在小烧杯中放有足够数量的 5％亚铁氰化钾溶液 [$K_4Fe(CN)_6$]，使它盖住烧杯底并有约 5 厘米厚的液层. 然后把一颗硫酸铜 ($CuSO_4$) 结晶浸入溶液中. 观察结晶周围膜的形成并注意膜是如何起伏和破裂.

观察：

B. 活组织对酸和碱的透性

准备好许多片紫万年青（凡是含有花青素的各种花或其它组织都可用）下表皮，把它漂浮在水中。

将少量的下列液体分别放在表玻璃或碟子中：

1．蒸馏水；

2．HCl(0.025 N)；

3．醋酸(0.025 N)；

4．KOH(0.025 N)；

5．NH_4OH(0.025 N)。

将两片表皮组织放入蒸馏水中(1)，两片放入 KOH(4)和6片放入NH_4OH 溶液中(5)。记下在浸入之后组织显出蓝色所需的时间。

在组织片浸入 NH_4OH 溶液转变为蓝色(全部或部分)以后，将4片组织片转移至盛有蒸馏水的烧杯中。

从蒸馏水烧杯中转移2片至醋酸溶液(3)并转移两片至HCl中(2)。记录发生颜色变化所需的时间。

当颜色变化已完成，把组织片从酸溶液转移至水，然后再回到 NH_4OH，再记录产生颜色变化所需要的时间。

按照以上方法重复进行几次，并测定组织几次转移到酸和几次转移到碱之后发生颜色变化所需的时间。

观察：

C. 离子对细胞膜特性的影响

在四个烧杯中分别放几个甜菜根(花瓣、红甘蓝、倒挂金钟的叶子以及含有丰富花青素的其它组织都可用）切片．然后向每个烧杯加总体积为 50 毫升的以下的液体：

1．蒸馏水；

2．4% NaCl 加蒸馏水(各为 25 毫升)；

3．0.2% $CaCl_2$ 加蒸馏水(各为 25 毫升)；

4．0.2% $CaCl_2$ 加 4% NaCl (各为 25 毫升)．

假如愿意的话，你可以用其它植物材料进行重复试验．

把烧杯放置在室温下，间歇搅拌一小时．在一小时后观察并记录各种溶液的颜色深度．

观察：

D. 膜对有机物质的透性

将紫鸭跖草、红洋葱叶子下表皮细胞或相同组织的细胞放在有几滴 1 M 甘油溶液的载玻片上，记录质壁分离所需的时间．

在显微镜下观察到已有质壁分离之后，让组织保留在甘油中一直到从质壁分离状况恢复过来．记录恢复所需的时间．

现在把这组织放到几滴蒸馏水中洗去甘油．在加水之后很快进行显微镜观察．发生了什么情况？

按照上述方法用以下有机物质(1.0 M)进行：葡萄糖、叔

丁醇、乙二醇和甲醇. 记住要记录在每种溶液中细胞质壁分离恢复所需的时间. 细胞从质壁分离的状态恢复过来的相对时间可以提供作为物质渗入细胞的相对次序的一个粗略的指标. 对每个化合物来说也指出了它的分子量和它在水中的溶解度.

观察和时间记录:

结果和结论

对方法的每一部分(A 到 D)都设计和提出一个适当的图表(或观察目录)来说明结果. 根据以下的指导来解释各部分的结果:

A. (1) 把一个金属的硅酸盐细丝当作一个膜和溶液系统. 指出什么分子进行扩散和扩散的方向.

(2) 对于透性来说,在各种情况下形成的是什么类型的膜?

(3) 普费福(Pfeffer)如何采用亚铁氰化铜的膜来进行他的渗透压实验?

(4) 当把植物细胞放入纯水中会发生不正常的破裂. 如何解释?

B. (1) 酸和碱对花青素的颜色有什么影响?

(2) 什么是花青素(化学的),它们位于细胞何处?

(3) 解释使用酸、碱后所观察到的任何差异.

C. 提出你可能想到的任何原因来说明一些离子对细胞膜特性(关于改变透性)的影响.

D. (1) 为什么把在甘油中质壁分离恢复的细胞放在纯

水之后会突然破裂呢？

（2）易于渗入植物细胞的有机化合物的化学和物理特性是什么？

参 考 文 献

Branton, D. 1969. Membrane Structure. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **20**:209-238.

Collander, R. 1959. Cell membranes: Their resistance to penetration and their capacity for transport. In: F. C. Steward (Ed.) Plant Physiology, A Treatise. Academic Press, New York. Vol. II. pp. 3-102.

Davson, H. and J. F. Danielli. 1952. The Permeability of Natural Membranes, 2nd ed. Macmillan Co., New York.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York.

Galston, A. W. 1961. The Life of the Green Plant. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

Giese, A. C. 1968. Cell Physiology, 3rd ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia, London, and Toronto. pp. 288-309.

Leggett, J. E. 1968. Salt absorption by plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **19**:333-346.

Leopold, A. C. 1964. Plant Growth and Development. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.

Lundegårdh, H. 1955. Mechanisms of absorption, transport, accumulation, and secretion of ions. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **6**: 1-24.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 44-52, 296-310.

Stadelmann, E. J. 1969. Permeability of the Plant Cell. *Ann Rev. Plant Physiol.* **20**:585-606.

实验 21 渗 透 势

目的

说明测定细胞液渗透势（渗透压）的经典的质壁分离法.

材料

植物材料（下面任何一种均可）：

紫万年青、吊竹梅（下表皮）、加拿大伊乐藻的叶片、各种丝状藻（水绵等）；分别准备以下克分子浓度的蔗糖和 NaCl 溶液（每种 50 毫升）：0.30，0.25，0.24，0.22，0.20，0.18，0.16，0.14，0.12，0.10；

表玻璃、点滴板或小烧杯；

显微镜；

载片及盖片；

小滴管和瓶子；

刀片；

镊子.

步骤

从带色吊竹梅叶片的中脉，切取新鲜的下表皮切片（或用已经提到的其它植物材料）. 迅速将切片投入含有 0.30 M 蔗糖溶液的表玻璃上，5—10 分钟后，取几片切片放在滴有同样溶液的载片上. 注意是否所有细胞都产生了质壁

分离.倘若如此，则取新切片，并放入0 .25 M蔗糖 溶 液中.若该浓度使全部细胞都发生质壁分 离，试 验0 .24 M的蔗糖溶液并如此继续下去，直至表现出某一蔗糖溶液中大部分细胞出现质壁分离，而在下一个较稀的一个蔗糖浓度中仅 50%的细胞显现出质壁分离的现象为止．将结果记录在表 21-1 中.

在达到决定极限浓度之前，一定要有足够时间使其发生质壁分离．当在切片中观察到初始质壁分离以后，用新溶液和新组织切片重复进行几次试验，直到你有把握确定出产生初始质壁分离的蔗糖浓度为止．在此条件下，细胞液的渗透势和外界溶液的渗透势相等.

表 21-1　渗透势测定的结果

在 20°C下蔗糖溶液		质壁分离的相对程度
克分子浓度(M)	渗透势(大气压)	
0.30	−8.1	
0.25	−6.7	
0.24	−6.4	
0.22	−5.9	
0.20	−5.3	
0 18	−4.7	
0.16	−4.2	
0.14	−3.7	
0.12	−3.2	
0.10	−2.6	

按照上述大体相同的步骤，仅以同样克分子浓度的盐溶液 (NaCl) 代替产生初始质壁分离的蔗糖溶液．若细胞全部出现质壁分离，测定细胞产生初始质壁分离的盐浓度 (以克分子浓度为基础)，指出 组 织产生初始质壁分离的盐溶液，并表示你在研究的组织中盐溶液产生初始质壁分离测定渗透势的计算.

观察：

结果和结论

提出你关于组织在各种糖溶液中试验条件下所观察到的现象．表 21-1 提供的是在 20°C时克分子浓度蔗糖溶液的渗透势．假定在 20°C以上每一度增加压力 1/273，则一溶液的浓度和溶液的渗透势之间有直接的比例关系，测定吊竹梅叶片细胞液的渗透势．

在你的结果中应该指出不同氯化钠浓度对质壁分离的作用．若用一个电解质，在测定其渗透势时还应考虑另外什么因素？

讨论中注意说明为什么由低溶质浓度的溶液引起的质壁分离和由高溶质浓度的溶液引起的质壁分离的程度不同．

指出理想的非电解质溶液测定渗透势的公式及其对调节电解质溶液渗透势的必要性．用冰点降低法怎样测定渗透势？具有高渗透势细胞的某些植物，有什么生态学意义？

参 考 文 献

Boyer, J. S. 1969. Measurement of the water status of plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20:351-364.

Briggs, G. E. 1967. Movement of water in plants. In: J. H. Burnett (Ed.) Botanical Monographs. F. A. Davis Co., Philadelphia. Vol. VII.

Crafts, A. S., H. B. Currier, and C. R. Stocking. 1949. Water in the Physiology of Plants. Chronica Botanica Co., Waltham, Massachusetts.

Dainty, J. 1963. Water relations of plant cells. In: R. D. Preston (Ed.) Advances in Botanical Research. Academic Press, New York

and London. Vol. 1. pp. 279-326.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 41-59.

Kozlowski, T. T. 1964. Water Metabolism in Plants. Harper and Row, New York.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 53-57.

Ray, P. M. 1960. On the theory of osmotic water movement. *Plant Physiol.* **35**: 783.

Sutcliffe, J. 1968. Plants and Water. St. Martin's Press, New York. pp. 29-31.

实验 22 水　势

目的

说明测定植物组织水势的经典方法.

材料

植物材料：白马铃薯块茎或白薯块根、甜菜根、水果（梨或苹果）；

木塞打孔器；

刀片；

分别准备以下克分子浓度的糖溶液（每种 150 毫升）：0.15，0.20，0.25，0.30，0.35，0.40，0.45，0.50，0.55，0.60；

250 毫升的烧杯若干套（每套 11 个）；

盘式天平；

量筒；

吸水纸；

滤纸；

铝箔.

步骤

用锐利的打孔器，从去皮并洗净的马铃薯（无栓化周围层）或从上面提到过的别的植物材料中的一种打长度相等（4.5 厘米）、直径约 1.0 厘米的圆柱体 22 个（每次打两个）．打好后立即切去两端，使圆柱体成 4 厘米长．放在两

张滤纸中间轻轻吸干，并暂时贮存在一个用潮湿的吸水纸衬着的密闭湿润的容器中.

样品达到要求数量之后，将其一对一对地称重（要尽可能快一些），记录下总鲜重. 称好重量以后，立刻将每对样品分别放入含有 150 毫升在表 22-1 中指出的溶液之一的烧杯中.

重复这个操作，直至圆柱体都浸入每种不同的糖溶液为止. 记住记录浸入相应糖溶液中每对圆柱体的原始鲜重.

表 22-1 马铃薯块茎组织的水势

蔗糖溶液（M）	渗透势（大气压）	圆柱体的鲜重		重量变化*
		开始	最后	
0.15	−4.0			
0.20	−5.8			
0.25	−6.7			
0.30	−8.1			
0.35	−9.6			
0.40	−11.1			
0.45	−12.7			
0.50	−14.3			
0.55	−16.0			
0.60	−17.0			

* 表示增重数值前用(+)，减重用(−)，不增不减用(±).

烧杯用铝箔盖好，在室温中放置 6 小时. 如果需要，在测定最后重量之前可在冰箱中放 24 小时.

达到预定时间以后，从溶液中取出圆柱体（一次取一对），用滤纸迅速吸干上面的水分并测其最后鲜重. 计算每对圆柱体比原来重量增加或是减少，并将结果记录在表22-1中.

计算：

结果和结论

以纵坐标作为重量变化，横坐标作为相应的糖浓度，用图 22-1 作成曲线表示之．组织的水势，等于不使圆柱体增减重量的糖溶液的水势．因此，曲线与横坐标的交叉点即表现为组织的水势．在后面的报告中说明其合理性．

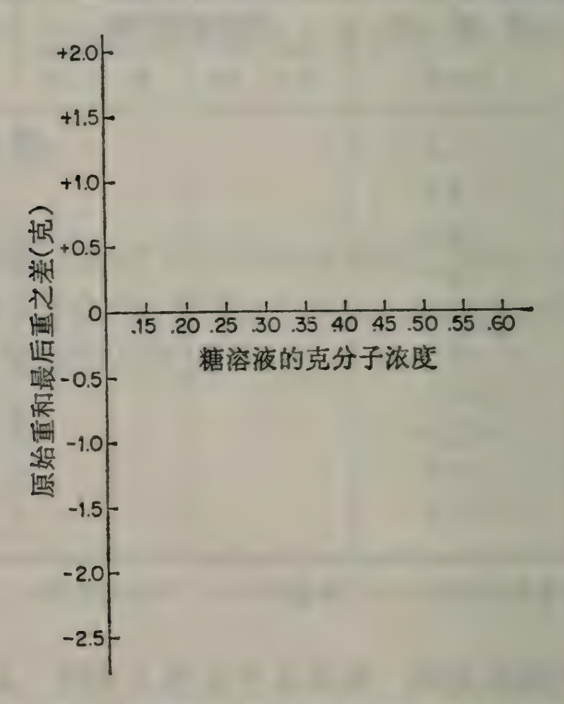


图 22-1 马铃薯块茎组织的圆柱体重量的变化是周围糖溶液克分子浓度的函数

指出马铃薯块茎组织在试验开始时的水势和圆柱体在每一种溶液中达平衡时的水势．

在报告的结论中，指出组织吸水和失水量之差．此外，

指出细胞和烧杯中不同糖溶液的水势、渗透势和涨压的关系。这三种渗透量在调节植物体水分移动方面以那一种最为重要？为什么？

你在解释结果时，也应该考虑到为了得到精确和预期的数值而在实验步骤中涉及的某些技术问题。

参考文献

Bonner, J. and A. W. Galston. 1952. Principles of Plant Physiology. W. H. Freeman and Co., San Francisco, California.

Boyer, J. S. 1969. Measurement of the water status of plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20: 351—364.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York pp. 50-52.

Galston, A. W. 1964. The Life of the Green Plant. Prentice Hall, Inc, Englewood Cliffs, New Jersey.

Kozlowski, T. T. 1964. Water Metabolism in Plants. Harper and Row, New York.

Kramer, P. J., E. B. Knipling, and L. N. Miller. 1966. Terminology of cell-water relations. *Science* 153: 899-890.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 68-73; 122-124.

Meyer. B. S., D. B. Anderson, and C. A. Swanson. 1955. Laboratory Plant Physiology, 3rd ed. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey.

Meyer, B. S. and A. M. Wallace. 1941. A comparison of two methods of determining the diffusion pressure deficit of potato tuber tissue. *Amer. J. Bot.* 28: 838-843.

Slatyer, R. O. and W. R. Gardner. 1965. Overall aspects of water movements in plants and soils. In: G. E. Fogg (Ed.) The State and Movement of Water in Living Organisms. Cambridge Univ. Press, New York. pp. 113-129.

Sutcliffe, J. 1968. Plants and Water. St. Martin's Press, New York. pp. 22-36.

实验 23　用落滴法测定植物组织水势

目的

用落滴法测定马铃薯块茎组织的水势.

材料

去皮马铃薯(芜菁、胡萝卜或叶组织)；
60 毫升蔗糖溶液(0.5 M)；
10 毫升亚甲蓝溶液(0.2%重量/容量在水中)；
8 支试管(15×150 毫米，最好有 10 毫升刻度)；
8 支试管(13×100 毫米)；
8 支毛细移液管 (或医用滴管拉成细管尖)；
移液管(10 毫 升刻度或 10 毫升配药用滴定管)；
试管架(放 16 支试管)；
打孔器(4 毫米内 径)；
镊子.

步骤

A. 不同蔗糖浓度的试验组和对照组

将 8 支试管 (15×150 毫米) 放成一排，按 所需体积加入 0.5 M 蔗糖溶液，使其用水稀释到 10 毫升，而 克 分子浓度的范围以 0.05 M 的梯度从 0.15 M 增加到 0.5 M，标出这一系列管为对照组. 然后取对照组每种溶液 4 毫升加到较小

的试管（13×100毫米），构成另一组同样浓度的蔗糖溶液（标为试验组）.将对照组的溶液按浓度递增的顺序放成一列.然后将试验组的管按相应位置放在第二列．用塞子塞住管以备使用.

B．马铃薯圆柱体水势的测定（下述的处理步骤稍不同于标准技术，因此随时间变化水势的测定是可以的）

用打孔器（内径4毫米）从新鲜去皮的马铃薯块茎上打一圆柱体，切成2厘米长，切后立即将圆柱体转入后排试验组的第一个蔗糖溶液中．照样处理试验组所剩下的7个管．试验溶液要淹没植物材料.

当试验组的每个管内都含有一个组织圆柱体时，各加一滴亚甲基蓝溶液（0.2% 重量/容量 在水中）并振荡.

30分钟后用毛细移液管从试验组的第一个管取出少量试验溶液．然后，将移液管保持在最初含有同样蔗糖浓度的对照组溶液表面下大约1吋的位置，缓慢地放出1滴蓝色的试验溶液，在无色透明的背景上观察液滴是上升还是下降或仅仅向外扩散．如果液滴上升，则试验溶液的密度就比它原来的值低．相反，如果密度增加了，则试验溶液的液滴将下降．如试验溶液的密度等于或接近对照溶液，则液滴不会明显地上升或下降，将要向外扩散．因为没有用细分的浓度，确实的"零点"必须有所补充.

所有试验溶液都按以上基本步骤处理，并在以后的两小时内间隔30分钟重复一次．在测定期间，使移液管用于各自的试验溶液，避免较大量的对照液和试验溶液之间的相互转移．同样，在取试验液滴前，移液管用试验溶液冲洗几次．在表23-1中记录结果.

表 23-1 马铃薯块茎组织水势测定结果

对照管（编号）	蔗糖溶液（克分子浓度）	渗透势（30°C时的大气压）	随时间（分）变化液滴移动方向*							
			15	30	45	60	75	90	105	120
1	0.15	−4.0								
2	0.20	−5.3								
3	0.25	−6.7								
4	0.30	−8.1								
5	0.35	−9.6								
6	0.40	−11.1								
7	0.45	−12.7								
8	0.50	−14.3								

* 指出在时间过程中试验液滴的相对移动，即：向上、向下或零点。如果没有明显的零点，观察要用补充值。

结果和结论

说明记录在表 23-1 中的结果，提出所试组织近似的水势值。要记住，组织的水势等于组织没有水分进入或向外移动时蔗糖溶液的渗透压。

在总结中注意说明当放进对照溶液时液滴上升或下降的原因。在什么条件下各试验溶液的密度增加、减少或不变？组织水势值怎样影响周围溶液密度的变化？

虽然组织水势的值在浸泡短时间后可以测定，在理论上较长时间后也是同样的，但是在实际上这个值是随时间而缓慢的变化着，你怎样从理论上来说明这种偏差？

如果实验 22 还没有做过，指出水势与渗透压及细胞的张压与试管中各种糖溶液的关系。这三种渗透量中的哪一种在调节植物中水的移动是最重要的？为什么？此外，在限定的渗透系统中水的移动如何依据自由能的概念来解释这些渗透量。

参 考 文 献

(see also references for Experiment 22)

Boyer, J. S. 1966. Isopiestic technique: measurement of accurate leaf water potentials. *Science* **154**: 1459-1460.

Boyer, J. S. 1969. Measurement of the water status of plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **20**: 351-364.

Brix, H. 1966. Errors in measurement of leaf water potential of some woody plants with the Schardakow dye method. Can. Dept. Forestry Publ. 1164. 11 pp.

Goode, J. E. and T. W. Hegarty. 1965. Measurement of water potential of leaves by methods involving immersion in sucrose solutions. *Nature* **206**: 109-110.

Knipling, E. B. 1967. Measurement of leaf water potential by the dye method. *Ecol.* **48**: 1038-1041.

Kozlowski, T. T. 1964. Water Metabolism in Plants. Harper and Row, New York. pp. 39-43.

Kramer, P. J., E. B. Knipling, and L. N. Miller. 1966. Terminology of cell water relations. *Science* **153**: 889-890.

Rehder, H. and K. Kreeb. 1961. Vergleichende Untersuchungen zur Bestimmung der Blattsaugspannung mit der gravimetrischen Methode und der Schardakow-Methode. *Ber. dutsch. Bot. Ges.* **74**: 95-98.

Shardakov, V. S. 1948. New field method for the determination of the suction pressure of plants. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* **60**: 169-172.

Sutcliffe, J. 1968. Plants and Water. St. Martin's Press, New York.

实验 24　水的内聚力与蒸腾的提升力

目的

研究用以解释水在植物体内因蒸腾和内聚作用而运动的物理系统.

材料

多孔陶瓷杯(参阅书后附录);
玻璃管(J 形, 长 100 厘米,孔径 1 毫米, 见图 24-1);
单孔橡皮塞, 塞于陶瓷杯, 内插 J 形管;
玻璃管(侧臂用);
广口瓶(见图 24-1);
二孔橡皮塞;
汞(清洁的);
烧杯(1 升);
环形支架;
电炉;
明胶液(20% 重量/容量).

步骤

A. 仪器安装

仪器在安装前, 所有部分都先用沸洗液充分洗过后, 再用蒸馏水冲洗干净备用.

安装仪器时，孔径为1毫米的玻璃管的直立部分的长度为100厘米以上，它的下端浸入汞液中1厘米. 贮存器里的汞需绝对清洁无尘或其它污物.

实验的成功依赖于陶瓷杯无裂缝或其它缺陷，圆杯的孔隙要尽量小. 但是即使是不完善的陶瓷蒸发表面，用下面介绍的方法也可得到满意的结果.

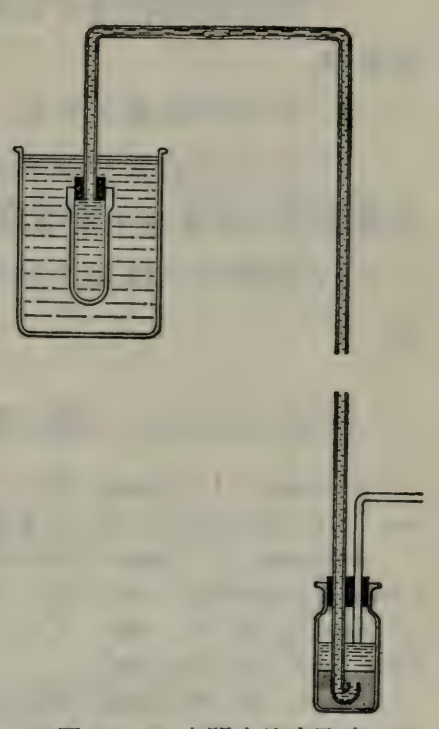


图 24-1 表明水的内聚力与蒸腾的提升力的装置

在仪器安装完毕后，装满新煮过的蒸馏水，将多孔圆杯浸在烧杯的蒸馏水中. 要保证系统中没有气泡，加热烧杯中的水接近沸腾，保持这种温度三小时. 使热水经虹吸并由侧管流出. 然后移去热源，将仪器冷却至室温. 在变冷的过程中，水将通过仪器继续缓慢虹吸.

B. 蒸腾的提升力和水的内聚力

装置冷却后，移开浸着圆杯的有水烧杯. 如果对陶瓷杯的完整有任何怀疑，当移去有水的烧杯后，可用20%明胶液浇灌圆杯表面. 用这个明胶作成的蒸发表面代替有孔隙的陶瓷.

可以看到水在垂直玻璃管中上升，汞柱也随之升高. 用电风扇慢慢吹陶瓷圆杯表面，则可加快液体升高的速率.

结果和结论

在回答下列问题的基础上解释你看到的现象：

1. 准确地解释为什么水和汞上升，什么因素决定上升的速率.

2. 你如何解释汞升高，能否以大气压力解释？

3. 从本试验怎样阐明水分内聚力的存在，并且为什么玻璃管柱内水分张力形成时没有发生汞与水的分离？

4. 怎样将本试验的原理说明植物茎中水分的升高的理论？

参 考 文 献

Askenasy, E. 1896a. Über des Saftsteigen. *Verhandl. naturhist med. Ver. (Heidelberg) N. S.* **5**: 325-345.

Askenasy, E. 1896b. Beiträge zur Erhlärung des Saftsteizens. *Verhandl. naturhist. med. Ver. (Heidelberg) N. S.* **5**: 429-448.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp. New York. pp. 102-108.

Dixon, H. H. 1914. Transpiration and the Ascent of Sap in Plants. Macmillan Co., London.

Kozlowski, T. T. 1964. Water Metabolism in Plants. Harper and Row, New York.

Kramer, P. J. 1949. Plant and Soil Water Relations. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co. Inc., Princeton, New Jersey. pp. 144-150.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and C. A. Swanson. 1955. Laboratory Plant Physiology, 3rd ed. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 54-56.

Sutcliffe, J. 1968. Plants and Water. St. Martin's Press, New York.

实验 25 蒸腾作用的牵引力和根压

目的

用有叶子的枝条证明蒸腾作用的牵引力及测定根压的大小和变化.

材料

盆栽的倒挂金钟(天竺葵、烟草或其它合适的植物);
橡皮管(长约 4 厘米);
毛细管(长 3 呎,内径 1—2 毫米);
线;
蜡;
小广口瓶(装有新鲜的冷开水或蒸馏水);
二孔橡皮塞;
J 形管(长臂长 80 厘米以上,内径 2—3 毫米);
铬酸洗液;
装有汞的小烧杯;
刀片.

步骤

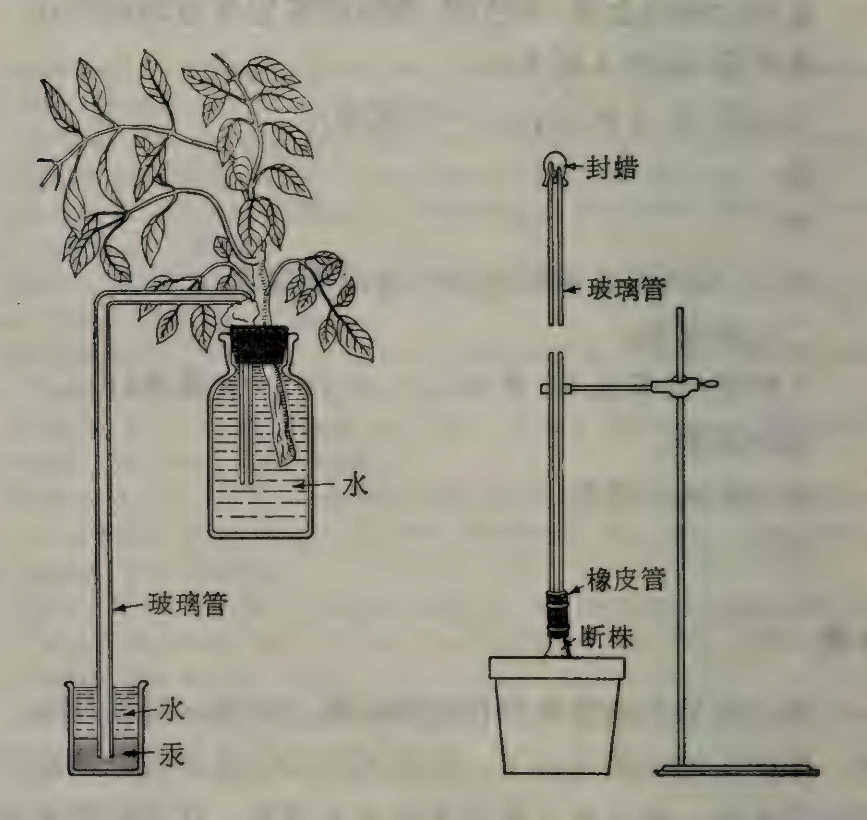
将已浇足水的盆栽倒挂金钟从距土表约 6 吋处切断. 切时, 保持茎的切面于水下. 如果不能很快地把枝条切断的末端放到水里, 则在水下再把茎切去 2 厘米. 直到你准备好进行 B 实验之前, 都要使枝条上面的切口部分保持在水内.

A. 根压(见图 25-1 B)

将一段湿润的橡皮管转动套至仍在盆内的植物断株上，在切口表面以上，橡皮管约留 2 厘米. 把毛细管 (3 呎长，内径 1—2 毫米)的一端插入橡皮管直至与断株相接，用铁环架和夹子将它固定。

用结实的线把断株和管子捆在一起，这种联接使在大的压力下不漏液体. 不要伤了茎皮. 用一滴蜡封住毛细管开口的末端并测量断株上面毛细管里空气的体积.

随着液体压入毛细管，空气体积将缩小而气压则成比例的增加. 因之，通过不同时间测量封闭在管内气体的体积，就



A. 蒸腾作用牵引力　　　　B. 根压

图 25-1　说明蒸腾作用牵引力及根压的装置

能测出根压的大小和变化．获得空气体积的读数，常常要超过两天．算出根压．

读数和计算：

B. 蒸腾作用的牵引力(见图 25-1 A)

在水里从植物茎基部剥去树皮并将木质部迅速地插入二孔橡皮塞．在盖上瓶塞时，使茎几乎达到盛有冷开水的小广口瓶的底部．

准备一根内径 2—3 毫米，长臂长 80 厘米以上的 J 形玻璃管，用铬酸洗液（小心！）清洗，洗净后再灌满蒸馏水并将它的短臂插进橡皮塞的第二个孔，一直到接近瓶子的底部．

把 J 形管长臂末端浸于汞内．从这个系统中排除所有的气泡及漏洞，必要时，在茎、毛细管及塞子周围涂上蜡．经常观察和记录汞柱的最大高度．

观察：

结果和结论

对于根压实验，用纵坐标表示根压(以大气压为单位)，对着横坐标表示时间(以小时为单位)，划图来说明结果．

根据你对根压的观察和结论回答下面的问题：

1．根压是依赖于根内的生活细胞吗？

2．能期望从迅速蒸腾的树表现出根压么？

3．普里斯特利 (Priestley) 的根压理论是什么？

4．根压如何影响液流？

5．在水生植物的运输中，根压是主要的力量还是蒸腾作用是主要的力量？

提出你关于证明蒸腾牵引力的结果并以呎为单位计算出地上部能使水上升的高度．为什么汞柱不能升得较高？在什么条件下，大气压力使汞柱上升多高？水呢？实验里哪些条件是在植物中不能达到的？

参 考 文 献

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 100-103.

Dixon, H. H. 1914. Transpiration and the Ascent of Sap in Plants. Macmillan Co., London.

Kozlowski T. T. 1964. Water Metabolism in Plants. Harper and Row, New York.

Kramer, P. J. 1949. Plant and Soil Water Relations. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey.

Steward, F. C. 1968. Growth and Organization in Plants. Addison-Wesley Publ. Co., Reading, Massachusetts.

Sutcliffe, J. 1968. Plants and Water. St. Martin's Press, New York.

Thut, H. F. 1928. Demonstration of the lifting power of evaporation. *Ohio J. Sci.* 28:292-298.

实验 26 气 孔

目的

说明用于获得叶片的远轴和近轴的表面印痕的硅酮橡皮技术；研究气孔的分布、保卫细胞的形状和气孔开关的机制.

材料

完整的菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)、玉米(*Zea mays* L.)或其他典型的双子叶与单子叶植物；

紫鸭跖草(*Tradescantia*)；

盆栽的草本植物(老鹳草、向日葵、菸草、菜豆等)；

硅酮橡皮化合物(液状硅酮橡胶)；

催化剂(Nuodex 或 Nuocure 28)；

指甲油(纯的或一般的)；

蔗糖溶液(1 M,在滴瓶中)；

苯；

解剖针；

镊子；

显微镜载片和盖片；

显微镜；

光源.

步骤

A. 硅酮橡皮和指甲油在叶表面的印痕

图 26-1 描述了制作叶表面印痕的过程．如图所示，把大约半调羹硅酮橡皮物放入培养皿内，并与大约 6 滴催化剂(Nuodex)混合均匀．催化剂的数量需视硅酮橡皮硬化所需时间而定．

立刻将少量混合物在要观察(见 B 部分)的叶表面部分涂一薄层，使制备物在叶上硬化(约 30—45 分钟)．在薄层硬化后用解剖针和镊子把它轻轻地从叶表面剥下来，这样产生的模子是最初的印痕，可储存在纸袋内，并正确地标明属名、种名和叶子的表面(上或下)．

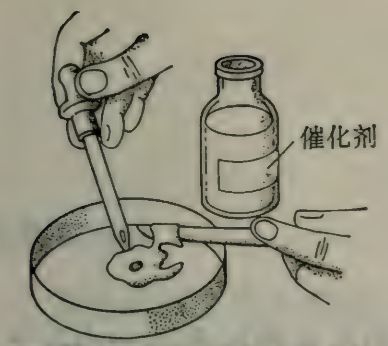
在获得这个最初的印模后，在其上面涂一薄层纯的或一般的指甲油，硬化后，用解剖针和镊子从初次印模上剥下第二次印模．

把第二次印模的粗糙面向上放在显微镜载玻片上，加一两滴水，放上盖玻片，以显微镜观察之．为了更好地观察，要调整反光镜和聚光镜，以便使检镜板和背景有反差．

B. 保卫细胞的形状与远轴和近轴叶表面气孔的相对分布

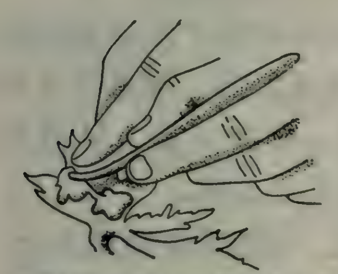
制备温室培养的菜豆和玉米上、下叶表面的初次和二次印痕；如果不能用这些植物，任何一种具有“菜豆”形保卫细胞的典型双子叶植物和具有“哑铃”形保卫细胞的典型单子叶植物都可用．但必须强调指出这种硅酮橡皮方法最适用于从光滑叶子获取印痕．

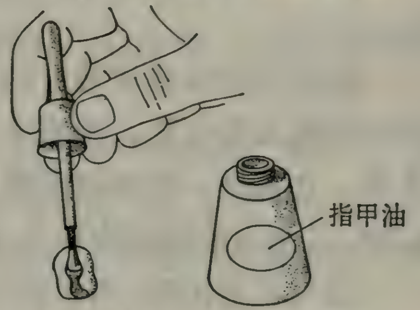
研究二次印痕，说明两种不同形状的保卫细胞和画出你



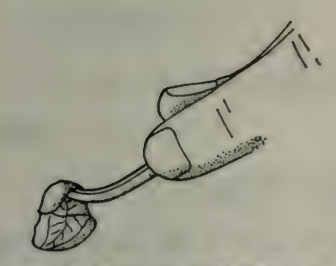
1. 在硅酮橡皮化合物中加入催化剂

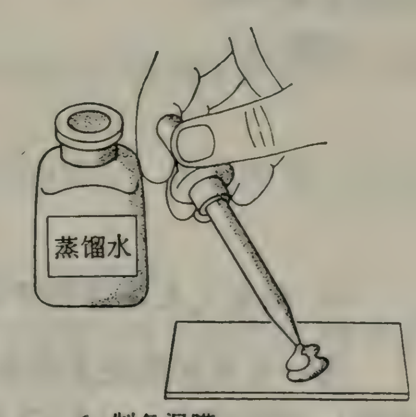

4. 在橡皮模表面上加指甲油


2. 在叶表面上涂橡皮化合物



5. 从橡皮模子上取下指甲油膜，
这膜是叶表面的复制品


3. 从叶表面移去橡皮模子



6. 制备湿膜

图 26-1　叶印痕的制备

的观察物的草图．此外，测定上、下表面气孔的相对数目．

如果时间允许，教师同意时，制做 5—10 片温室生长植物的叶下表皮印痕，在高倍显微镜下计算面积，求出每平方厘米叶表面气孔平均数．

观察与计算：

C. 气孔的开关

剥下已在强光下保持一段时间的紫鸭跖草的一小片下表皮。

把这片表皮放于载片的水中，在高倍物镜下尽可能地选择开得最大的气孔。观察含有质体的表皮细胞。测量气孔的宽度。在盖片一端用滤纸吸水，而从另一端滴一滴 1 M 蔗糖溶液，以便用蔗糖溶液取代水。观察气孔几分钟。

在气孔关闭后，用水取代蔗糖溶液。可能需要冲洗几次，摆正显微镜恰使载片透过强光，不时地观察，测定气孔重新开放所需的时间。

观察：

D. 测定气孔是否张开的苯渗入法

选一盆栽和灌足水的草本植物（老鹳草、菜豆、向日葵、菸草等），照射强光一小时以上。将这植物放在强光源前，用毛刷沾少量苯涂于一片叶的下表皮上。

注意叶片上涂过苯的面积呈半透明状。

把植物在黑暗中放一小时以上，并重复苯渗透试验。记录你的观察。

观察：

结果和结论

提出你对各部分实验的结果和解释.

根据对下列问题的回答做出结论性的报告:

1. 在用硅酮橡皮印痕技术研究气孔分布、大小和形状时优点及缺点是什么?

2. 虽然这个试验中未表明,但玉米所特有的"哑铃形"保卫细胞的运动和"菜豆"形保卫细胞在气孔开闭上有什么不同? 这个"菜豆"形的保卫细胞具有比较厚的内壁而前者没有.

3. 在双子叶植物中哪一面叶片表面有较多的气孔?在单子叶植物呢?

4. 是否多而小的孔比少而明显大的孔丧失更多水分?请解释.

5. 什么引起保卫细胞渗透势的变化? 保卫细胞的水势的变化如何调节气孔的开闭?

6. 什么样的环境条件影响气孔的开闭?

7. 为什么苯能通过张开的气孔进入叶子而在同样条件下水却不能?

8. 苯渗入法是否适用于测定气孔的开闭?

参 考 文 献

Alvim, P. de T. and J. R. Havis. 1954. An improved infiltration series for studying stomatal opening as illustrated with coffee. *Plant Phys.* **29**:97-98.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp.,

New York. pp.67-73.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 77-88.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and C. A. Swanson. 1955. Laboratory Plant Physiology, 3rd ed. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. p. 46.

North, C. 1956. A technique for measuring structural features of plant epidermis using cellulose acetate films. Nature 178:1186-1187.

Steward, F. C. 1968. Growth and Organization in Plants. Addison-Wesley Publ. Co., Reading, Massachusetts.

Waggoner, P. E. and I. Zelitch. 1965. Transpiration and stomata of leaves. *Science* **150**:1413-1420.

Zelitch, I. 1963. Stomata and water relations in plants. Connecticut Agri. Exp. Sta. Bull. No. 664.

Zelitch, I. 1965. Environmental and biochemical control of stomatal movement in leaves. Biol. Rev. 40:463-482.

Zelitch, I. 1969. Stomatal Control. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **20**: 329-350.

实验 27 用盆栽植物的失重测定蒸腾速度

目的

利用在不同环境条件下，盆栽植物的重量变化，测量蒸腾速度。

材料

6 盆盆栽植物（菜豆、菸草、番茄或向日葵）；
油布（也可用铝箔）；
线或橡皮绳；
石蜡；
暗箱或橱柜；
面积计（不是必需的）。

步骤

给栽培在 4 吋盆中的 6 盆植物过量地浇水，把盆停放着直到过量水排出，然后把每盆用大块油布（也可用铝箔）完全包好，还用一小块棉花包住茎的基部，再把按植物茎大小留小孔、剪开又能併起的两块油布盖好土壤表面，把盖土壤表面的油布整理好不使边缝露出来，用线或橡皮绳仔细捆绑好，用石蜡把棉花和油布上的所有开口都密封上。

立即记录各盆植物的重量，再把它放到要求的环境条件中。建议把植物放在以下的处理中：

1．黑暗；

2．强光；

3．柔和光；

4．在开动的风扇前面的柔和光；

5．在开动的风扇前面的强光；

6．温室的光线、湿度和温度条件．

不管什么环境条件，在8小时或更长时间内，每隔1或2小时给每盆植物称重．记录重量，通过最初和后来的重量之差计算水分丧失的数量．

观察：

温室中（6个处理）的植物可研究几天，白天相隔2小时测定一次重量．每天第一次测定应在早晨尽可能早的时候，而末次读数应在晚上．而且，如果可以用适当的记录仪器的话，可以看出植物蒸腾作用的每天周期性和环境条件变化相关联．

在实验末尾从植物上除去全部的叶子并把这些叶子在纸上描出来，用面积计从这些图测出植物的叶总面积，并换算成平方分米．计算每两小时每平方分米叶面上水分减少的数量．

计算：

结果和结论

以每平方分米叶面上丧失的水分为纵坐标，以时间为横

坐标绘图来表明试验结果.

在结论中，要说明影响蒸腾速度的主要环境因子有关的结果和气孔的扩散能力所起的作用. 你是否认为在田地里生长的植物也会表现出和盆栽植物一样类型的蒸腾周期性？在使用本试验中略述的这个方法来测定过长时间的蒸腾速度时可能会有些什么缺点？

参 考 文 献

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 62-63.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 89-97.

Meyer B. S., D. B. Anderson, and C. A. Swanson. 1955. Laboratory Plant Physiology, 3rd ed. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey.

Sutcliffe, J. 1963. Plants and Water. St. Martin's Press, New York.

实验 28　用氯化钴纸测定蒸腾速度

目的

叙述用于测定不同植物上下叶表面丧失水分的氯化钴纸的制备、标准化和利用；测定光对叶子丧失水分的影响.

材料

10 株植物(生长在温室的不同种植物)；

4株菜豆(实验前各两株分别保持在光下和暗中数小时)；

200 毫升氯化钴溶液(3%，重量/容量；5.5 克$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ +94.5 毫升水)，滴入几滴 HCl 使其呈微酸性；

HCl(浓)放在滴瓶中；

塑料盘(装满水，盖上金属丝网)；

塑料盘(浸泡滤纸条用)；

5 个滤纸条(1 厘米宽，20 厘米长)；

4 个滤纸条(1 厘米宽，5 厘米长)；

橡皮板；

10 张吸墨纸；

烘箱(40—50°C)；

干燥器(底部有一盘无水氯化钙)；

镊子；

剪刀；

10 个培养皿；

盖片；

纸夹.

步骤

A. 氯化钴纸的制备(实验前制备纸)

制备 3%的氯化钴溶液 (5.5 克 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ + 94.5 毫升水)滴几滴 HCl 调成弱酸性. 然后把滤纸条(1 厘米宽, 20 厘米长)放在氯化钴溶液中浸透,以同样方法处理几个较短的滤纸条(1 厘米宽,4 厘米长).

把浸透的纸条细心地在橡皮板上滚转除去多余的溶液. 再夹在吸墨纸中, 放在 40—50℃ 的烘箱内使其部分干燥, 当纸边开始变蓝时,从烘箱内取出,用电烙铁完全弄干它. 由蓝色均匀程度判断,凡是浸泡不均匀的纸条都不要.

把留用的纸条,放在有氯化钙的干燥器内 24 小时或者等到它们标准化.

B. 氯化钴纸的标准化

将短条氯化钴纸(4 厘米长,1 厘米宽),放在金属网上,金属网放在盛好水的塑料盘顶上. 盘中的水平面要距金属网下面几个毫米. 要有充足的时间使纸从蓝色变成粉红色或白色, 把这纸条留在金属网上并作为和其他纸条比较的颜色标准.

用镊子迅速地从干燥器中取出一张氯化钴纸, 放在金属网上标准色纸旁边, 注意这纸条变为和标准色一样的粉红色所需要的时间. 把这纸条放回干燥器, 当它恢复为原来的蓝色时, 再重复标准化过程, 每张氯化钴纸都必须做几次标准化. 记录每次颜色变化所需的时间, 计算每张纸条平均标准化时间.

颜色变化(秒)和平均标准化时间:

在每张氯化钴纸最后一次标准化后,把它剪成 20 个小方块(每个方块 1 厘米×1 厘米),把这 20 个方块放入写好平均标准化时间的一个培养皿中,把这个培养皿放到干燥器中储存起来以备应用.

C. 上、下表皮的相对蒸腾速度

用镊子把几张标准化了的氯化钴纸方块从干燥器中迅速取出,并使其紧贴在几种不同植物叶片的两个表面上,将盖片放在每个方块上并用纸夹固定.

和标准化时一样记录钴纸从蓝变成粉红色所需的时间.用不同的氯化钴纸块重复几次实验,记录每张纸变色所需时间并求平均值.如果 20 分钟内还未发生完全的颜色变化,则蒸腾速度记为"可忽略".

观察:

D. 照光和黑暗对植物丧失水分的影响

在实验前把几盆很好灌溉的菜豆(或其他植物)放在黑暗中过夜或过几小时,同样也把另外的很好灌溉的菜豆放在光下.

按照前面叙述的(C 项)氯化钴纸法测定在光下的植物的水分丧失的相对速度.最少做 10 次上下叶表面的测定,并分

别记录氯化钴纸变色时间及其平均值.

完成植物在光下的测定后，把保留在黑暗中的植物移到实验室柔和光线下，按照和光下一样的操作手续测定水分丧失的相对速度，记录你的结果和平均时间.

观察：

结果和结论

为得到所研究植物的相对蒸腾速度有用的数值，按下法计算蒸腾指数(TI)：

$$TI = \frac{\text{氯化钴纸标准化时间(平均时间以秒计)}}{\text{在叶上氯化钴纸变色时间(平均时间以秒计)}}$$

从不同研究植物计算得到的数值，可以考虑做为相对蒸腾速度. 你计算得到的商值越高，则蒸腾速度就越大.

将所得结果列在一个合适的表里表明你的观察和每部分试验的计算值.

在结论中解释关于叶子上、下表皮水分丧失相对速度的结果和光与暗对于相对蒸腾速度的影响. 在你的结论中考虑以下问题：

1. 是否有些植物表现出上表皮比下表皮的蒸腾速度低？解释之.

2. 能用氯化钴纸法测定绝对蒸腾速度吗？解释之.

3. 光和暗对叶丧失水分速度的影响是什么？

4. 在用氯化钴纸法测定叶表面的精确的蒸腾速度时某些固有的"陷阱"是什么？

参 考 文 献

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 62-66.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 70-102.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and C. A. Swanson. 1955. Laboratory Plant Physiology, 3rd ed. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey.

Sutcliffe, J. 1968. Plants and Water. St. Martin's Press, New York. pp. 46-50.

实验 29　研究蒸腾作用的蒸腾计法

目的

通过蒸腾计法测量，研究各种环境因素对蒸腾作用的影响.

材料

草本植物(老鹳草、向日葵、菜豆、番茄、或倒挂金钟)；
广口瓶及塞子；
打孔器一套；
水 1000 毫升(煮沸后冷至室温)；
碟形盘；
毛细管；
明亮的光源；
风扇.

步骤

A. 蒸腾计的仪器

如图 29-1 所示，按下面步骤准备蒸腾计：

1. 选一个合适但稍紧一点的广口瓶塞，在塞子上打一个小洞(给打另一个直径相当于植物茎粗细的洞，留下足够的地方)使足以插入 U 形毛细管的末端.

2. 从塞子下边用打孔器打第二个洞，洞的直径使正好与

老鹳草或其他合适植物的茎的大小一致．洞打好后，不必移去打孔器．

3．在水里切断老鹳草(用碟形盘或水槽)，将带有茎叶部分的切口一端插入从塞子上突出来的打孔器内(也在水里)．后面有关茎的切断的末端、塞子和瓶子的操作均在水下完成．

4．随同拔出打孔器，通过塞子抽出茎，并立即将这塞子盖到装满冷开水的小广口瓶上，茎伸进瓶内约1—2吋．瓶塞不必盖得太紧．

5．当茎的切断的末端在瓶内的水里时，就可从水槽里移出全部装置，并把U形毛细管的一端插到瓶塞上剩下的孔里，



图 29-1　蒸腾计装置

毛细管伸进瓶内约1吋.

6. 毛细管也要用水灌满. 把毛细管打开的一端放入预先装有冷开水的烧杯或烧瓶中，以后盖紧瓶塞，这将使有足够量的水从灌满了的瓶内流入管中并排出了这个系统里的空气. 把毛细管打开的一端保持在有水的烧杯内，这样，这个系统就没有漏洞. 必要的话，可用蜡封闭瓶塞上的任何开口.

B. 蒸腾计的操作

整个系统完全灌满水后，沿毛细管水平部分选一段合适的距离，用蜡笔标出始点和终点.

将毛细管打开的一端离开烧杯水面片刻，为管内引入一个小气泡，气泡一经引入，即把管的末端放回水内. 这个引进的气泡，就作为蒸腾速率的标记，以表明在一定时间内，气泡通过毛细管水平部分规定距离内的速度.

C. 各种环境因素对蒸腾作用的影响

在实验室和温室内选择不同的位置，通过温度、湿度、光强、风及气泡移动速率的记录测量，研究各种环境因素对蒸腾作用的影响.

观察：

结果和结论

对用蒸腾计方法测定各种因素对蒸腾作用速率的影响的结果提出合适的说明和正确的结论.

你的结论必须建立在回答下面问题的基础上：

1. 蒸腾计方法是确切地测量蒸腾作用的吗？为什么认为它不是一个精确的方法？根据马克西莫夫(Maximov)蒸腾计方法，可能有大到50%的误差. 解释之.

2. 为什么在蒸腾计中用无空气的水？

3. 那些条件妨碍蒸腾作用？

4. 虽然在阴蔽情况下气孔没有关闭，但是为什么蒸腾作用的速率，通常在阳光下比阴蔽处要大？

参 考 文 献

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Co., New York. pp. 62-64.

Kozlowski, T. T. 1964. Water Metabolism in Plants. Harper and Row, New York.

Kramer, P. J. 1959. Transpiration and the water economy of plants. In: F. C. Steward (Ed.)Plant Physiology, A Treatise. Academic Press, New York. Vol. II, pp. 607-726.

Maximov, N. A. 1929. The Plant in Relation to Water. English translation by R. H. Yapp. G. Allen and Unwin, London.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 89—92.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and C. A. Swanson. 1955. Laboratory Plant Physiology, 3rd ed D. Van Nostrand Co., Inc. Princeton, New Jersey. pp. 42—46.

Sutcliffe, J. 1968. Plants and Water. St. Martin's Press, New York. pp. 49—50.

实验 30　植物内水分上升途径和速率

目的

研究酸性品红水溶液在植物内上升的速率及有染料运转的各种组织.

材料

盆栽的向日葵(或其他至少 50 厘米高的草本植物);
100 毫升酸性品红溶液(0.25%,容量/容量);
小瓶子;
水盆;
剃刀;
光源;
载片和盖片;
显微镜.

步骤

洗去 50 厘米高或更高的盆栽向日葵根上的泥土. 将整个根系浸于水中,切掉根长 5 厘米以外的部分. 5 分钟以后,转移这棵植物使其根系浸于 0.25%的酸性品红溶液中,并立即切去根长 2 厘米以外的所有部分. 植物仍保留在酸性品红里,放它于明亮的光源前面.

测定酸性品红上升 50 厘米距离所需的时间. 将茎充分透明,以便直接观察酸性品红在茎内上升的情况.

让酸性品红上升到叶，观察它向叶内维管束的移动．在显微镜下检查一个叶片并注意酸性品红已完全渗入到叶子的导管内．也可切一些茎和根的横切片和纵切片，画图并标出那些组织渗入了酸性品红．

观察：

结果和结论

在你的结果中指出酸性品红向茎上面运动的速率，画出你所观察的茎的横切面和纵切面的图形．

结论的要点要考虑到操作对茎内水分运动速率的影响．关于从根到叶，水分输导系统连续性的实验说明了什么？在具有完整根系的植物中，水分的上升为什么不能象实验中所指出的那样快？请说明．

参 考 文 献

Bonner, J. and A. W. Galston 1952. Principles of Plant Physiology. W. H. Freeman and Co., San Francisco.

Crafts, A. S., H. B. Currier, and C. R. Stocking. 1949. Water in the Physiology of Plants. Chronica Botanica Co., Waltham, Massachusetts.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Co., New York. pp. 87—108.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 130—150.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and C. A. Swanson. 1955. Laboratory Plant Physiology, 3rd ed. D. Van Nostrand and Co., Inc. Princeton, New Jersey. p. 52.

Sutcliffe, J. 1968. Plants and Water. St. Martin's Press, New York.

实验 31　孟希(Münch)压力流动模型

目的

研究用孟希(Münch)提出的物理系统来解释溶质通过植物筛管的单向流动.

材料

200 毫升含碘和碘化钾 (I_2KI) 的蔗糖溶液 (把 40 克蔗糖、10 克碘和 20 克碘化钾溶于水,定容到 200 毫升);

200 毫升淀粉溶液(5%,重量/容量);

200 毫升葡萄糖溶液(40%,重量/容量);

葡萄糖"试带"(或 Benedict 试剂);

4 条透析管(7 吋长,浸在水里);

4 个单孔的橡皮塞;

4 个螺旋夹;

线绳;

2 支 U 形玻璃管(内径 3—4 毫米,见图 31-1);

4 只烧杯(600 毫升).

步骤

A. 碘、碘化钾(I_2KI)试剂的流动

选择一条预先用水浸湿的透析管(大约 7 吋长). 拧旋其一端,并将其折回,用线绳或螺旋夹确实扎紧. 用手指擦开另

一端，把5%（重量/容量）可溶性淀粉溶液注入其内，使液面离管顶端不到1吋．把单孔橡皮塞较小的一头插入透析囊开口的一端，将管子和橡皮塞捆得紧密无缝．把玻璃管（内径约3—4毫米）的U形部分，通过橡皮塞的孔插入淀粉溶液．要使玻璃管插的很适合．

选择另一条透析管，如前捆紧一端．用蔗糖和I_2KI溶液注入管内，使液面离管顶端不到1吋．用前述同样的方法塞住透析管开口的一端，并通过橡皮塞的孔把U形管的另一端插入蔗糖-I_2KI溶液．确实使U形管每一端都没有漏缝．

如图31-1所示，用铁环架和夹支持整个系统，并把每个透析囊完全浸在分开的烧杯的水中．在两小时末尾观察结果．

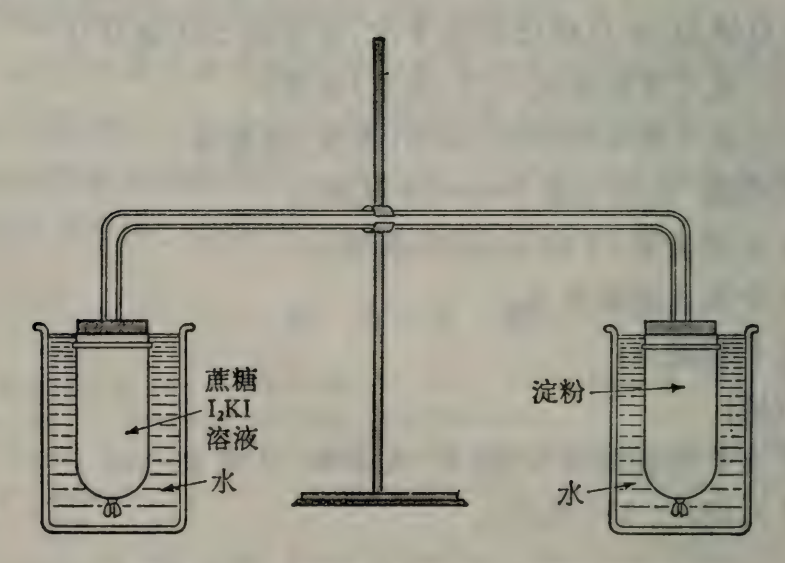


图 31-1 证明孟希(Münch)压力流动的装置

观察：

B. 葡萄糖的流动

如A项准备同样模型，但在这里，一条透析囊中注入葡萄糖溶液，另一个装蒸馏水．象前述那样支持这个系统，每个透析囊浸入各烧杯的水中．这样保持24小时以后取走透析囊，测定每一个中葡萄糖含量．把一条“试带”浸入溶液中，用葡萄糖“试带”来测定葡萄糖．取走“试带”，观察颜色变化．将“试带”的颜色和预先准备好的比色卡相比．

如果葡萄糖“试带”不能用，可按实验5（E项）所介绍的步骤，进行一次标准的Benedict试法来测定．

观察和测定葡萄糖：

结果和结论

报告你的观察和结果，在结论的叙述中考虑以下问题：

1．涨压对碘化钾-碘试剂和葡萄糖从一囊向另一囊流动有什么影响？

2．在此实验中研究的系统与生活植物中的运输系统相似处何在？

3．为什么在此实验中研究的模型在说明植物中具渗透活性的有机物质的运输是有用的？

4．与孟希压力流动模型完全相似的有机溶质运输机理的相反的观点是什么？

5．在此实验中用的物质压力流动模型的设计与孟希最初设计的模型不同吗？说明之．

参考文献

Crafts, A. S. 1951. Movement of assimilates, viruses, growth regulators, and chemical indicators in plants. *Botany Rev.* **17**, 203—284.

Crafts, A. S. 1961. Translocation in Plants. Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York.

Curtis, O. F. 1935. The Translocation of Solutes in Plants. McGraw-Hill Book Co., New York.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 201—204.

Kursanov, A. L. 1963. Metabolism and transport of organic substances in the phloem. In: R. D. Preston (Ed.) Advances in Botanical Research. Academic Press, New York. Vol. 1. pp. 209—278.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 368—371.

Münch, E. 1931. Die Stoffbenegungen in der Pflanze. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.

Swanson, C. A. 1959. Translocation of organic solutes. In: F. C. Steward (Ed.) Plant Physiology, A Treatise. Academic Press, New York. Vol. II. pp. 481—551.

Zimmermann, M. H. 1960. Transport in the phloem. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **11**: 167—190.

实验 32　苯丙氨酸脱氨酶的提取和性质

目的

为了从苗龄 4 天的燕麦幼苗中提取苯丙氨酸脱氨酶 (L-phenylalanine ammonia lyase),并研究 pH、底物、酶和时间对 L-苯丙氨酸酶促转化成为反-肉桂酸的影响.

材料

40 克苗龄 4 天的燕麦幼苗(见步骤 A 项);
缓冲液(见书后附录)
17 毫升酶制剂(见步骤 C 和 D 项);
25 毫升苯丙氨酸溶液(10 毫克/毫升 H_2O,重量/容量);
5 毫升苯丙氨酸溶液(5 毫克/毫升 H_2O,重量/容量);
100 毫升 HCl(5 N);
1000 毫升丙酮(−15°C);
分析天平;
瓷漏斗(与抽气泵相连);
滤纸 (Whatman No. 3);
研钵和杵(冷冻);
冰浴;
水浴(30°C);
组织捣碎机;
pH 计;

离心管；

离心机(冰冻)；

磁力搅拌器(或搅拌棒)；

33 个试管；

测定用比色杯(配对)；

紫外分光光度计(波长在 290 毫微米).

步骤

A. 苗龄 4 天的燕麦幼苗

燕麦种子在 0.05% Tween-20 溶液中浸泡 30 分钟，然后播种在蛭石中，在暗中保持 4 天. 40 克植物材料需要约 800 棵幼苗(2 盘)，可得到约 2 克含酶的丙酮粉. 因此植物材料的数量可按比例增加或减少.

B. 酶的提取和丙酮粉的制备

将约 40 克(鲜重)苗龄 4 天的燕麦幼苗(用在蛭石面上割下的面上部分)加 300 毫升冷丙酮(−15°C)，在组织捣碎机中匀浆化 60 秒.

用抽气泵，通过瓷漏斗(放一张 Whatman No. 3 滤纸)过滤匀浆，另用冷丙酮把留在滤纸上的残渣洗几遍. 铺开这些残渣，使其在室温下干燥. 用研钵和杵粉碎干燥的残渣，贮藏在冰库的密封容器中. 这些丙酮粉贮藏在冰库中，至少在几个星期中是稳定的.

C. 用于反应混合物的酶制剂

把丙酮粉悬浮在冷的硼酸盐缓冲液中(缓冲液 1 号，pH 8.8)，其浓度为 10 毫克/毫升缓冲液. 要为以下实验作成足

够的酶制剂.

用磁力搅拌器使悬浮液在稳定而轻微的搅动下在 4℃ 保持 30 分钟.

用冰冻离心机把悬浮液在 14,000×g 离心 20—30 分钟. 上清液中含有酶,应小心地倒出,立即使用或冰冻起来. 冰冻酶制剂的活性能保持几天. 因此,下面的实验要计划好,不至使你经常制备酶.

D. 苯丙氨酸脱氨酶的检定

为了对酶活性作一个简单的鉴定,标记三个试管,并且按表 32-1 所述,加入组分.

表 32-1 苯丙氨酸脱氨酶的活性

组 分	试管号码及加入的体积（毫升）		
	1	2	3
苯丙氨酸（10 毫克/毫升 H_2O）	0	1.0	1.0
蒸馏水	3.5	2.5	2.5
硼酸盐缓冲液（0.1 M, pH 8.8）	1.5	1.5	1.5
酶制剂*	0.5	0.5（煮沸）	0.5
总体积	5.5	5.5	5.5

* 加酶即开始反应，在 30℃ 保温 1 小时.

在加入最后一个组分(酶制剂)后,轻微地摇动试管,混合物在 30℃ 保温 1 小时. 保温结束时,在每个试管中加入 0.5 毫升5 N HCl 停止其反应. 然后把每个试管中的内含物倒入测定用的小比色杯，用适当的分光光度计在 290 毫微米测定吸收. 记下读到的光密度.

溶于 pH 8.8 的硼酸盐缓冲液的产物反-肉桂酸的消光系数，在 290 毫微米处稍大于 10,000. 而底物苯丙氨酸在这个

波长几乎没有吸收.

从含有活性酶的反应混合物(试管 3)的光密度值减去含有煮沸酶的反应混合物(试管 2)的光密度值得到底物吸收的光密度值(OD)，根据这可测定酶活性的量. 现在用这差异来计算每个酶单位的酶活性量. 一个酶单位定义为在标准检定时，每小时产生 0.01 吸收增加的酶量。除了这种吸收的变化外，还相当于 6 毫升最终混合物(即 5.5 毫升反应混合物加上 0.5 毫升 5 N HCl)大约形成 1 微克肉桂酸。所以你应当能计算在完全反应混合物中形成的肉桂酸量.

光密度值和计算：

E. 时间进程研究

在 6 支试管(标号 2—7)中的每一个加入下列组分：

组　　分	体　积 (毫升)
苯丙氨酸 (10 毫克/毫升 H_2O)	1.0
蒸馏水	2.8
硼酸盐缓冲液 (pH 8.8)	1.5
酶制剂(加入即开始反应)	0.5
总体积	5.5

不到开始反应不加酶. 再取一支试管(第 1 号)，其中不加底物，总体积用外加的水调到 5.5 毫升.

开始反应时(0 时)每个试管中加入酶(0.5 毫升). 然后仅在第 1 号试管中加入 0.5 毫升 5 N HCl，其余的试管每过10分钟用加入 0.5 毫升 5 N HCl 来停止其反应(全部进程为 1 小时). 例如：2 号试管在零时后 10 分钟停止；3 号试管在

20分钟后；4号试管在30分钟后等等.

在每个试管停止反应后，用一空白调节分光光度计在290毫微米处，并测定相应的反应混合物的吸收.

记录从每个反应混合物得到的光密度.

光密度值和形成产物的量：

F. 酶活性的最适 pH

标记6支试管，按表32-2指出的，加入不同的组分. 按前面介绍的相同的步骤来开始和停止反应并测定酶活性. 由于酶活性的最适 pH 是根据相对值来确定，因此就不需一个含有无活性酶的完全反应混合物. 所以直接测定的光密度值可用于计算在不同 pH 形成的最终产物的量.

表 32-2 酶活性的最适 pH

组分	试管号码及加入的体积（毫升）					
	1*	2	3	4	5	6
苯丙氨酸（10毫克/毫升 H_2O）	0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
蒸馏水	3.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
磷酸缓冲液（pH 6.2）	0	1.5	0	0	0	0
硼酸缓冲液（pH 8.0）	0	0	1.5	0	0	0
硼酸缓冲液（pH 8.8）	1.5	0	0	1.5	0	0
硼酸缓冲液（pH 9.0）	0	0	0	0	1.5	0
硼酸缓冲液（pH 10.0）	0	0	0	0	0	1.5
酶制剂**	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
总体积（毫升）	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5

* 反应物空白.

** 加入酶即开始反应，在30°C保温1小时.

光密度读数和计算：

G. 底物浓度对酶活性的影响

用前面讲的同样的组分和同样的操作步骤做实验，只是改变底物浓度.

一个实验用的、适合的底物浓度范围如下：0,0.5,1.0,1.5,2.0,3.0和5.0毫克苯丙氨酸/反应混合物. 不包括底物的反应混合物可用作反应物空白.

必须记住,所有的反应混合物都必须保持同样浓度的酶、缓冲液（用硼酸盐缓冲液1号,pH 8.8）以及同样的总体积(5.5毫升). 按上述改变底物浓度的一种方法是，先制备一个浓度为5毫克/毫升水的苯丙氨酸溶液,然后在相应的试管中加入适当的量. 反应混合物的最终体积用加入适量的蒸馏水调到5.5毫升.

在下面空白处写上你的实验设计和试管型号，然后按照你的计划进行实验.

实验设计和结果：

H. 增加酶浓度的影响

设计和做一个实验，以测定增加酶浓度对苯丙氨酸转化成肉桂酸速率的影响. 按照以前同样的基本步骤，但这里要用不同数量的酶制剂.

一个简便的方法是按照下述体积，向对应的反应混合物中加入酶制剂(10毫克丙酮粉/1毫升缓冲液)：0，0.2，0.4，0.5，0.7，0.9，1.0毫升．所有反应混合物都应包含：1毫升底物(10毫克/毫升 H_2O)，2.5毫升 H_2O，不同量的酶制剂，足够的硼酸盐缓冲液(pH 8.8)以调节最终体积到5.5毫升．也需准备一个反应物空白(无底物)．记住，为调节浊度的变化，每个酶量都需要一个相应的空白．

在下面空白处写出你的实验设计和你的实验结果：

结果和结论

对每项((E,F,G,H)结果作图，酶活性(基于光密度的变化或者形成产物的数量)作纵坐标，而不同的测定(即底物浓度、酶浓度、pH和时间)为横坐标．

根据影响酶活性的各种因素解释这些结果，包括为什么一个特别因素影响酶活性的理由．列出通常的化学方程式(表示底物和产物的结构)表明苯丙氨酸酶促转化成反-肉桂酸．

对于高等植物，关系到各种黄酮类化合物(花青甙等)和各种化合物，如咖啡酸、*p*-香豆酸、奎宁酸和绿原酸的最终合成；这个反应的重要性是什么？上述各种化合物在调节植物生长和发育中是否重要？解释之．

参 考 文 献

Hanson, K. R. and M. Zucker. 1963. The biosynthesis of chlorogenic acid and related conjugates of the hydroxycinnamic acids. Chromatographic separation and characterization. *J. Biol. Chem.* 238: 1105—1115.

Havir, E. A. and K. R. Hanson. 1968. L-Phenylalanine ammonia-lyase. I. Purification and molecular size of the enzyme from potato tubers. *Biochem.* **7**: 1896—1903.

Havir, E. A. and K. R. Hanson. 1968. L-Phenylalanine ammonia-lyase. II. Mechanism and kinetic properties of the enzyme from potato tubers. *Biochem.* **7**: 1904—1914.

Koukol, J. and E. E. Conn. 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of Hordeum vulgare. *J. Biol. Chem.* **236**: 2692—2698.

Marsh, H. V., Jr., E. A. Havir. and K. R. Hanson. 1968. L-Phenylalanine ammonialyase. III. Properties of the enzyme from maize seedlings. *Biochem.* **7**: 1915.

Zucker, M. 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol.* **40**: 779—784.

实验 33 组织中某些呼吸酶的检定

目的

学习用于检定植物组织中的脱氢酶、氧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶的一些快速技术.

材料

2 个去皮的白马铃薯块茎;

1 个花椰菜(需 15 克);

100 毫升 2,3,5-三苯基四唑(鎓)化氯溶液(0.5%,重量/容量);

100 毫升甲基蓝溶液(0.025%,重量/容量);

100 毫升愈伤树胶乙醇溶液(2%,重量/容量; 2 克愈伤树胶溶于足够的 95%乙醇中,定容到/100 毫升);

过氧化氢(市售商品,3%);

30 毫升过氧化氢(1 份 3%过氧化氢加 3 份水);

200 毫升乙醇(95%);

200 毫升柠檬酸盐缓冲液[10 克柠檬酸(一水化合物)加 95.3 毫升 1 N NaOH,再与等体积水混合,大约 pH 5.0];

25 毫升连苯三酚溶液(5%,重量/容量);

乙醚;

10 毫升硫酸(10%);

4 个培养皿;

2 个试管;

沸水浴；

研缽和杵；

石英砂；

滤纸；

瓷漏斗和有侧臂的吸滤瓶；

量筒(100 毫升)；

2 个锥形瓶(250 毫升)；

分液漏斗.

步骤

A. 脱氢酶

制备几片马铃薯块茎组织的薄片，把一半组织片放入培养皿中，沉在 0.5%2,3,5-三苯基四唑化氯溶液中，观察 当化合物明显还原时出现的红色，薄片显示有脱氢酶的存在 一般在 15 分钟内发生.

把剩余的组织片浸入沸水中至少 5 分钟，取出并同 前 面那样浸入染料溶液中.

观察：

也可以用另一种方法来鉴定脱氢酶，即从马铃薯块 茎 切下 10 小块立方体组织(每边长 5 毫米). 把 5 块放入小试 管中；另外 5 块放入有沸水的小烧杯中至少 20 分钟，然 后 把它们移入小试管.

每个试管都用 0.025 % 甲基蓝溶液充满， 用塞子塞紧. 除去管内所有的气泡. 在保温 24 小时后观察管内发生 的 颜

色变化.

从试管中取出这些小块，放在一张纸上，使它们充分接触空气. 观察所发生的颜色变化.

观察：

B. 氧化酶

切下一片至少包含一个芽的马铃薯块茎的横切薄片. 把切片放在培养皿中，用新配的2%愈伤树胶乙醇溶液淹没表面. 一般在15分钟内由于树胶的氧化，显出蓝色. 用先浸在沸水中至少5分钟的马铃薯薄片，重复此测定.

观察：

C. 过氧化物酶

1. 马铃薯组织：

准备一片至少包含有一个芽的马铃薯块茎的横切薄片. 把它放在培养皿中，并用新配好的2%愈伤树胶乙醇溶液浸没其表面. 过10—15分钟后，排出切片表面的树胶溶液，而用过氧化氢稀溶液（1份3%过氧化氢加30份水）代替. 与氧化酶鉴定相比较，注意在蓝色显示的速度和强度上的不同. 用先在沸水中浸没至少5分钟的马铃薯薄片，重复此试验.

观察：

2．花椰菜的过氧化物酶：

a. 过氧化物酶溶液：将15克花椰菜放在研钵中加20毫升95%乙醇和少许石英砂磨花椰菜2分钟．加70毫升乙醇，进一步研磨．在瓷漏斗的滤纸上收集粗纤维，并转移到100毫升的量筒中．用足够量的柠檬酸盐缓冲液(pH 5.0)再悬浮，并使容积到100毫升．在缓冲液中搅拌粉末，并保温约1小时．

b. 反应混合物和红紫棓精的形成：把20毫升过氧化物酶制剂移入一个试管．把试管放入沸水浴至少15分钟．把另外20毫升过氧化物酶制剂的蛋白转移到含有180毫升蒸馏水的250毫升三角瓶中．然后加10毫升新配制的5%连苯三酚溶液和1毫升3%过氧化氢．充分混合，并在5分钟后加5毫升10%H_2SO_4，混合．

用分液漏斗，振摇提取形成的琥珀色红紫棓精到乙醚中．用煮沸过的过氧化物酶制剂，重复这些步骤，并且比较两种情况下形成红紫棓精的相对量，测定在两种情况下的反应程度．

观察：

D. 过氧化氢酶

用稀过氧化氢（1份3%H_2O_2加30份水）没过一片马铃薯薄片，观察表明有此酶存在的氧气气泡的逸出．用先在沸

水中至少浸 5 分钟的马铃薯薄片重复此实验.

观察:

结果和结论

指出在每一测定中所包含的基本反应和所研究的酶在生物学上的重要性.

参 考 文 献

Beevers, H. 1961. Respiratory Metabolism in Plants. Row, Peterson and Co., Evanston, Illinois.

Bonner, J. and J. E. Varner (Eds.) 1965. Plant Biochemistry. Academic Press, New York and London.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York.

Glick, D. 1949. Techniques of Histo- and Cyto-Chemistry. Interscience Publ., Inc., New York.

Meyer. B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and C. A. Swanson. 1955. Laboratory Plant Physiology, 3rd ed. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey.

Stiles, W. and W. Leach. 1960. Respiration in Plants, 4th ed. John Wiley and Sons., Inc., New York.

实验 34 植物线粒体琥珀酸脱氢酶的活性

目的

鉴定花椰菜线粒体制剂中琥珀酸脱氢酶的活性.

材料

一个花椰菜(*Brassica oleracea* L.);

45 毫升由 0.5 M 蔗糖加 0.1 M KH_2PO_4 组成的溶液(溶解 171 克蔗糖+13.6 克 KH_2PO_4 并用水稀释到 1 升，将 pH 调到 7.3);

4 毫升含有0.4 M 蔗糖,0.02 M KH_2PO_4,0.005 M $MgCl_2$ 和 0.02 M 葡萄糖的悬浮液（溶解 136.8 克蔗糖，2.72 克 KH_2PO_4,0.475 克 $MgCl_2$,3.60 克葡萄糖并用水稀释到 1 升);

40 毫升磷酸盐缓冲液,pH 7.0（见书后附录);

10 毫升 2,6-二氯酚靛酚溶液（1.7×10^{-3}M);

5 毫升 $MgSO_4$(0.5 M);

5 毫升 KCN(0.1 M);

5 毫升 HCl(5%,容量/容量);

10 毫升琥珀酸钠(0.25 M),用 NaOH 将 pH 调到 7.0;

吸水纸;

研钵和研杵;

刀片;

石英砂；

纱布(二层)；

冰冻离心机、离心管；

玻璃组织匀浆器；

移液管(1毫升，5毫升，有刻度)；

比色杯(或 Klett 管)；

分光光度计或光电比色计(定在620毫微米)；

天平．

步骤

A. 从花椰菜制备线粒体

花椰菜是线粒体的最好来源．使用前，在自来水中洗花椰菜的头，在蒸馏水中漂洗，包在湿毛巾中，最好在实验前在冰箱中放12小时．另外，用于制备线粒体所有溶液和容器均应冰冻．

取下顶端2—3毫米不成熟花序(花椰菜的小花)，弃去头的其余部分。按照后面的步骤提取（在上课前完成线粒体制备，以等份分配给每个大学生或组)：

1．在一个有35毫升冰冻的研磨溶液（0.5 M 蔗糖＋0.1M KH_2PO_4，pH 7.3)的冷研钵中，研磨约15克的花椰菜，在组织中加少量冷的试剂及白砂促进研磨；

2．使悬浮液通过一层棉布，滤出液在4°C 500×g 离心10分钟；

3．轻轻倒出上清液，并在0—4°C 20000× g 离心 30分钟；

4．丢掉上清液，再悬浮颗粒在10毫升研磨溶液中，利用一个电动匀浆器，假若是有的话；

5. 再离心悬浮液（从步骤 4 来的）在 20000 × g（0—4℃）30 分钟，并丢弃上清液（这一步骤是取决于要求的相对纯度及可用时间）；

6. 悬浮颗粒（含有线粒体）在 4 毫升的悬浮溶液（0.4M 蔗糖；0.02 M KH_2PO_4，pH 7.2；0.02 M 葡萄糖；0.005 M $MgCl_2$）中，制剂可以立即冰冻，以后使用，但对于最适酶活性应立即利用。

B. 酶活性的鉴定

作一个简单的琥珀酸脱氢酶活性的实验，加贮备液的毫升数（表 34-1）于标记上 1—7 标准的 Klett 或比色管中。底物、线粒体及染料的用量稍微更动可产生适宜的结果。虽然利用表 34-1 作为指导，然后作适当的调节是必需的。

表 34-1 测琥珀酸脱氢酶活性的反应混合物

贮备液*	管号						
	1	2	3	4	5	6	7
磷酸盐缓冲液 pH 7.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
$MgSO_4$(0.5 M)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
KCN(0.1 M)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
HCl(5%，容量/容量)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
2,6-二氯酚靛酚(1.7×10^{-3}M)	无	0.2	0.2	0.2	0.2	无	0.2
水	3.8	4.0	3.6	4.0	3.6	3.6	3.4
线粒体制剂	0.4	无	0.4（煮沸）	0.4	0.4	0.6	0.6
琥珀酸钠(0.25 M)	0.4	0.4	0.4	无	0.4	0.4	0.4
总体积	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

* 数目表明使用贮备液的毫升数。

最后加入底物，当反应要开始时，振动各个管以混合内含物。在用分光光度计或比色计时，用管 1 和管 2 作空白。此外，用管 1 和管 6 调节被 5 和 7 管中线粒体制剂不同量所产

生的浊度改变的量.在620毫微米，60分钟内，记录反应混合物在零时和每隔十分钟的透射百分率. 在含有全部反应混合物的管内，蓝色的2,6-二氯酚靛酚(氧化型)颜色就要变浅或变为无色(还原型). 反应程度可根据所有的管与对照相比来判断. 记录你的结果在表34-2中.

表 34-2 琥珀酸脱氢酶活性随时间的变化

透射百分率(于620毫微米)							
时间(分)	0	10	20	30	40	50	60
管号							
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							

按照时间的多少和可用的设备，你可以进行各种实验，在增加底物浓度(酶不变)，增加酶浓度(底物不变)或已知的一个竞争性抑制剂的作用(丙二酸)的基础上测定反应速度. 实验由教师来决定.

结果和结论

记录你的酶活性随时间变化的结果于表34-2中. 为此，以酶活性作纵坐标对变化的实验作一个图.

关于线粒体分离步骤及琥珀酸脱氢酶促成的反应可以得出结论，一定要考虑到用于反应混合物中底物和产物的性质及其他组份的作用. 说出线粒体中其他酶或酶组的名称. 此外，考虑线粒体的结构及它的一般功能.

参考文献

Beevers, H. 1961. Respiratory Metabolism in Plants. Row, Peterson and Co., Evanston, Illinois.

Beevers, H., M. L. Stiller, and V. S. Butt. 1966. Metabolism of Organic Acids. In: F. C. Steward (Ed.) Plant Physiology, A Treatise. Academic Press, New York. Vol. IV B. pp. 119—262.

Chance, B., W. D. Bonner, Jr., and B. T. Storey. 1968. Electron transport in respiration. Ann. Rev. Plant Physiol. 19: 295—320.

Cooperstein, S. J., A. Lazarow, and N. J. Kurfess. 1950. A microspectrophotometric method for the determination of succinic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 186(1): 129—139.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 11-13; 120.

Doby, G. 1965. Plant Biochemistry, rev. ed. Interscience Publ. London, New York, and Sydney.

Green, D. 1959. Mitochondrial structure and function. In: T., Hayashi (Ed.) Subcellular Particles. Ronald Press, New York.

Lehninger, A. L. 1965. Bioenergetics. W. A. Benjamin, Inc., New York.

Loewy, A. G. and P. Siekevitz. 1963. Cell Structure and Function. Holt, Rinehart and Winston, Inc. New York.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey.

Ziegler, D., A. Linnane, and D. Green. 1958. Studies on the electron transport system, XI. Correlation of the morphology and enzymic properties of mitochondrial and sub-mitochondrial particles. *Biochem. Biophys. Acta.* 28:524-538.

实验 35 光和温度对光合作用的影响

目的

测定光强度和温度随时间对伊乐藻(*Elodea*)小枝光合作用速度的影响.

材料

伊乐藻(*Elodea*)小枝；
100 毫升碳酸氢钠溶液(0.1%)；
大试管(直径约 18 毫米)；
刀片；
玻璃棒；
高强度白光源；
光度表(如果方便时)；
米尺；
温度计(C°)；
烧杯.

步骤

A. 气泡计算方法

取健康的伊乐藻(*Elodea*)小枝，并切除下端. 顶端向下浸到一个含有碳酸氢钠水溶液（0.1%）的大试管中. 假若切除的一端没有在溶液里面，把嫩枝绑在一个玻璃棒上，使它在

里面.

B. 在不同光条件下光合作用的相对速度

用加有溶液的管在室温下使伊乐藻小枝曝晒在强烈的人工光照下 2 分钟，然后分三个时间，每次一分钟计算放出气泡的数目. 置放植物在漫射光中 2 分钟，然后如前测定其光合作用速度. 假若小枝不能适当地反应，再选择另一个，重复上面的实验. 把植物放在室中最黑暗处. 2 分钟后再测定速度. 用几个试验测定植物对一个突然改变的光强度反应多么快.

这个实验可用许多方法改进. 光强度和物体与光源距离之间的关系如下：

$$I_2=I_1\left(\frac{d_1}{d_2}\right)^2$$

因此，假若在光与植物之间最初的距离(d_1)加倍了(d_2)，那么最初的光强度就减少到只剩下¼(新的光强度$=I_2$). 利用这个方程式及一个最初的光强度读数（可用光度计），逐渐增加植物离开光源的距离（最近距离为厘米），记录几个一分钟测定的光合作用速度. 浸伊乐藻小枝的碳酸氢钠溶液的温度要保持恒定。假若愿意，可利用一个光电池去测定每一新的光强度，但这不是绝对必要的，因为离开光源的距离和要测定的光合作用速度之间是同样的相互关系.

观察：

C. 温度对于伊乐藻光合作用速度的作用

在 20，30，40，50°C 在强光中测定光合作用速度. 保持光

强度不变，并对每一温度作 10 个 1 分钟的计数．升高温度将试管转移到一个预先加热到高于要求的温度 1—2°C 的有水的烧杯中去．

结果和结论

画曲线表示光强度及温度在与时间的关系中对光合作用速度的影响．

在评价结果时，你要考虑以下内容：

植物释放的气体，用于测定光合作用速度的方法的可靠性，用于测定光强度的单位，光强度及光量之间的区别，用碳酸氢钠溶液的原因，在低光强度下为什么没有气泡释放出来，在什么状况下改变光强度能够比较有效的影响光合作用，说几种可能的原因．

描述一个增加二氧化碳浓度对光合作用速度没有影响的情况．记录考虑到的对光合作用必需的一切因素，并讨论一下在一个正常植物的 24 小时时间（白天及黑夜）中这些因素是如何限制了这一过程的．

参 考 文 献

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 258-283.

Franck, J., and W. E. Loomis (Eds.) 1949. Photosynthesis in Plants. Iowa State College Press, Ames, Iowa.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 190-229.

实验 36　叶圆片光合作用的测量

目的

以实验说明叶圆片碳酸氢钠渗入法如何用于测量植物组织中光合速度的研究；用叶圆片渗入法测量一些变数对光合作用的影响。

材料

锦紫苏的斑叶(绿-白型)；

菜豆的叶子(也可用其他的薄型叶，如菸叶)；

柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液(pH 6.8，见书后附录)；

$NaHCO_3$ 在柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中，10^{-3}M 溶液 (pH 6.8，见书后附录)；

$NaHCO_3$ 在柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中，10^{-2}M 溶液 (pH 6.8，见书后附录)；

烧杯(1000 毫升)；

打孔器(内径为 1 厘米)；

渗入装置(几个样品瓶、两孔橡皮塞、玻璃管和橡皮管、吸气器，见图 36-1)；

培养皿(5 厘米直径)；

光源(反射泛光灯，150 瓦灯泡)；

铁环和支架；

呎烛光计；

计时器.

步骤

A. 锦紫苏斑叶圆片的光合作用

1. 叶圆片的制备和碳酸氢钠的渗入：所有操作均需在柔和的实验室光线条件下进行.

从锦紫苏植株上切取数片斑叶(绿-白型)，置于盛有自来水的烧杯中 1 小时. 勿使这些离体叶片暴于亮光下. 浸泡之后，用打孔器从叶子的含叶绿素部分打下 15 个圆片 (直径约 1 厘米). 立即各取 5 个圆片放到 3 个样品皿或 125 毫升瓶中，其中盛有 25 毫升 $NaHCO_3$ 在柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 中的 0.01 M 溶液.

用一个装配有玻璃管和橡皮管并与一自来水吸气器相连的两孔橡皮塞将容器塞上，如图 36-1 所示.

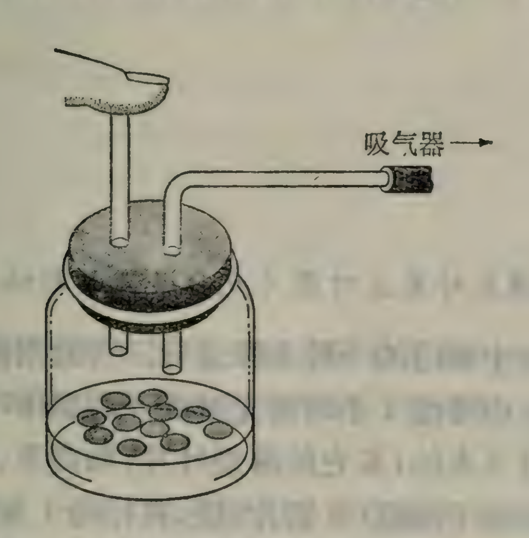


图36-1 叶圆片的渗入

用食指按住开端玻璃管，打开水龙头抽气. 然后放开指头骤然地解除真空. 继续这渗入的方法，直到当圆片静止在容器底部的情况下，其边缘没有气泡产生时为止. 如果有一

个或两个圆片不符合要求，可用另外的圆片代替.

将经过渗入的圆片和悬浮溶液倒入一小培养皿（直径5厘米）中，将这些圆片彼此不接触地排列在皿的底部（用一玻璃棒）.如果还有小气泡附着在圆片上，则在照光前将之赶掉.

2. 光合作用的测量：将盛有圆片的培养皿置于一钨丝灯（断路）下. 此灯放在圆片上方一定距离，使它们可以发射出大约1500—2000呎烛光强度的光来.

打开灯光并记下每圆片自照光到它升到液体表面或向边缘转移的时间（以秒计）. 如果有一、两个圆片没有适当的反应，可以不作数.

圆片上升或向边缘转移所需时间与其光合速度成反比. 于是，光合速度可以用时间（以秒计）的倒数表示.

用相同数目的从锦紫苏叶片的白色部分得到的圆片重复同样的操作. 将这结果与含叶绿素圆片所得结果相比较.

观察：

B. 光强度对菜豆叶圆片光合速度的影响

用与A中相同的一般步骤进行. 实验用的叶圆片是从预先在自来水中浸泡1小时的充分展开的离体叶片的主要叶脉之间部分打下来的（其它的薄型叶片，如菸草，也可以用）.

用叶片的不同组（5圆片/组，直径约1厘米）测量在250，500，1000和2000呎烛光下的光合速度. 调整灯在样品上面的距离来获得不同水平的光强度. 但是，当光强度大于2000呎烛光时，需用一玻璃盛水器过滤，这样试液不致变热.

观察：

C. 在蒸馏水或碳酸氢钠溶液中抽空的叶圆片的光合作用

从菜豆植物(也可以用其他的薄型叶片)完全展开的叶片主脉之间部分制备 15 个叶圆片．在打圆片之前,叶片一定要在自来水中浸泡 1 小时．在每个样品皿中放 5 个圆片：

1．柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液(pH 6.8)

2．柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液加 $NaHCO_3$(0.001 M)

3．柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液加 $NaHCO_3$(0.01 M)

按照前面叙述的步骤，使每瓶的圆片渗入和照光（约 2000 呎烛光)．

观察：

结果和结论

作一表或图阐明本实验每一部分圆片的相对光合速度．

作一个关于本实验的步骤和结果的一般结论．可按下列提纲考虑答案：

为什么曝于光下时，绿色圆片上升到缓冲的碳酸氢钠溶液的表面或向末端转移？这个实验阐明了光合作用的哪个方面？叶绿素的作用是什么？

当圆片单以缓冲液渗入时，是否可能进行这实验？在此实验的完成中碳酸氢钠起什么作用？与叶组织光合速度的希

尔反应(实验 37) 相比，叶圆片渗入法有哪些优点？

参考文献

Arnon, D. I. 1960. The role of light in photosynthesis. Sci Amer. 203(5):104-118.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 213-283.

Downes, H. 1962. The Chemistry of Living Cells, 2nd ed. Harper and Row, New York.

Fork, D. C. and J. Amesz. 1969. Action spectra and energy transfer in photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20:305-328.

Hale, L. J. 1958. Biological Laboratory Data. John Wiley and Sons, Inc., New York, p. 73.

Hendricks, S. B. 1968. How light interacts with living matter. *Sci. Amer.* 219 (3):174-186.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 190-229.

Park, R. B. 1965. The Chloroplast. In: J. Bonner and J. E. Varner (Eds.) Plant Biochemistry. Academic Press, New York. pp. 124-150.

Rosenberg, J. L. 1965. Photosynthesis. Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York.

San Pietro, A., I. A. Greer, and T. J. Army (Eds.)1967. Harvesting the Sun. Photosynthesis in Plant Life. Academic Press, New York and London.

Wickliff, J. L. and R. M. Chasson. 1964. Measurement of photosynthesis in plant tissues using bicarbonate solutions. *Bioscience* 14:32-33.

Wickliff, J. L. and R. M. Chasson. 1967. Influence of virus infection on photosyntheis. In: Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society, A. Kelman (Chmn). Source Book of Laboratory Exercises in Plant Pathology. W. H. Freeman and Co., San Francisco and London. pp. 163-165.

实验 37 希尔反应

目的

以实例说明希尔反应——叶绿体所催化的依靠光还原菸酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP) 以外的一种物质的反应；确定莠去津(atrazine)对希尔反应的影响.

材料

10 克新鲜菠菜叶；

200 毫升三(羟甲基)甲基甘氨酸 (tricine) 缓冲液 (0.05 M,调节到 pH 6.5)；

0.1 毫升莠去津溶液(饱和溶液)；

100 毫升 2,6-二氯酚靛酚(1.1×10^{-4}M)溶液；

2 个冰浴(装有碎冰和 NaCl 的烧杯)；

水浴(装满室温水的 400 毫升烧杯)；

吸水纸；

剪刀；

薄纱纸；

研缽和研杵(冷冻的)；

瓷漏斗；

吸滤瓶；

离心管；

离心机；

铁环架；

铝箔；
5 支 10 毫升移液管(刻度的)；
2 支 1 毫升移液管(刻度的)；
8 个比色计液槽；
比色计(在 620 毫微米处使用).

步骤

A. 叶绿体的分离

在开始叶绿体分离之前，先准备两个在大烧杯里放碎冰和 NaCl 的冰浴. 用这些冰浴冷却所有的试剂、玻璃器皿和最后得到的叶绿体悬浮液.

称取 10 克经过洗净、吸干水并经过冷却的菠菜叶片(用新鲜菠菜). 叶片用剪刀剪碎(弃去大叶脉)，并在一冷冻研钵中加 60 毫升冰冷的调至 pH 6.5 的 0.05 M 三(羟甲基)甲基甘氨酸缓冲液，研磨两分钟成匀浆.

在一瓷漏斗里放上 3 块用缓冲液浸湿的薄纱纸，减压抽滤匀浆. 收集滤液并弃去残渣.

在一临床用离心机中，全速离心滤液 4—5 分钟. 弃去上清液后，用 20 毫升冰冷的缓冲液洗涤叶绿体颗粒并重新离心. 弃去上清液，再用 20 毫升缓冲液洗涤颗粒. 离心后，弃去上清液，重新悬浮这颗粒于 8 毫升 0.05 M 三(羟甲基)甲基甘氨酸缓冲液中. 在搅动这悬浮液时，容器一定要浸在冰浴里.

B. 希尔反应

将一个盛满自来水(20°C)的 400 毫升烧杯放在一铁环架上，与相距约 6 吋的一个 100 瓦的灯成一直线.

在柔和的实验室光线下，用移液管移取5.0毫升2,6-二氯酚靛酚($1.1\times10^{-4}M$)和5.0毫升三(羟甲基)甲基甘氨酸缓冲液到3个比色计的或分光光度计的液槽里去.

用铝箔包住其中一个液槽以使光射不进去.将所有液槽放入400毫升水浴2分钟.然后用移液管移取0.5毫升叶绿体悬浮液到每个液槽，并振荡均匀.将所有液槽放回水浴，打开灯，液槽照光5分钟.

5分钟后，用一比色计在620毫微米处测量曝于光下的一个液槽的混合物和一个包以铝箔的液槽的混合物(对照)的吸收率(与一水空白相比).在读下后一液槽的读数后，加入几毫克抗坏血酸，记下反应混合物颜色的变化.在10分钟的末尾(从开始时算起总的时间)，读下其它液槽的读数(与一水空白相比).

希尔反应的正确测量是从每个曝光的液槽得到的光密度读数中减去对照(用铝箔包住的液槽)的读数.

C. 莠去津对希尔反应的影响

按表37-1用移液管加必需组份到相应标记的比色计液槽里去.在加叶绿体悬浮液前，将所有液槽放水浴(25°C)中两分钟.然后用移液管移取叶绿体悬浮液入液槽，振荡均匀后再放入水浴，液槽照光10分钟.

10分钟后，测量每个混合物的吸收率(与一水空白相比，比色计定在620毫微米处).在表37-1的空格中记下每个混合物的读数和调整值(减去对照).

D. 希尔反应时间进程的研究

如有时间的话，设计和进行一个阐明希尔反应随时间变化的实验.记住要用合适的对照、适宜的反应成分、和前面所

表 37-1 莠去津对希尔反应的影响

组份*	液槽号码				
	1	2	3**	4***	5
0.05M tricine缓冲液(pH 6.5)	5.0	5.0	5.0	5.0	4.9
2,6-二氯酚靛酚(1.1×10^{-4}M)	无	5.0	5.0	5.0	5.0
蒸馏水	5.0	无	无	无	无
莠去津(饱和溶液)	无	无	无	无	0.1
叶绿体悬浮液	0.5	0.5	0.5	0.5 (经煮沸)	0.5
照光持续时间(分钟)	10	10	暗	10	10
比色计读数					
调整读数(减去对照)					

* 列出的有关成份的数字为其毫升数.

** 液槽 3 必须用铝箔包住.

*** 将部分叶绿体悬浮液煮沸 10 分钟钝化，然后使之冷却，用缓冲液调到原体积再加入液槽 4.

列举的基本技术.

在下面空白处写出你的实验设计和(或)你的实验结果:

结果和结论

叙述在实验各部分得到的结果，如果作了时间进程，则以希尔反应速率(用最初的 OD 值减去对照得到的修正值，或者用还原的染料量)为纵坐标，对横坐标时间作图.

解释你的结果，并用一常用的方程式说明希尔反应的细节. 探讨叶绿体、光、水、三(羟甲基)甲基甘氨酸缓冲液和 2,6-二氯酚靛酚起的作用. 莠去津对希尔反应的影响是什么? 叙述关于莠去津或其他三嗪类化合物对光合作用影响的现在

流行的解释．其它除莠剂也影响希尔反应吗？

参 考 文 献

Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*. 24:1-5.

Arnon, D. I. 1960. The role of light in photosynthesis *Sci. Amer*. 203(5):104-118.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 213-236.

Gest, H., A. San Pietro, and L. P. Vernon (Eds.) 1963. Bacterial Photosynthesis. The Antioch Press, Yellow Springs, Ohio.

Hill, R. 1937. Oxygen evolved by isolated chloroplasts. *Nature* 139:881.

Holt, A. S., R. E. Smith, and C. S. French. 1951. Dye reduction by illuminated chloroplasts. *Plant Physiol*. 26:164-175.

Jagendorf, A. T. 1956. Oxidation and reduction of pyridine nucleotides by purified chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys*. 62:141-150.

Kamen, M. D. 1963. Primary Process in Photosynthesis. Academic Press, New York.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand, Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 198-199.

Moreland, D. E. 1967. Mechanisms of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol*. 18:365-386.

Park, R. B. 1965. The chloroplast. In: J. Bonner and J. E. Varner (Eds.) Plant Biochemistry. Academic Press, New York. pp. 124-150.

San Pietro, A. (Ed.) 1965. Non-Heme iron Proteins. The Antioch Press, Yellow Springs, Ohio.

San Pietro, A. and C. C. Black. 1965. Enzymology of energy conversion in Photosynthesis. *Ann. Rev. Plant. Physiol*. 16: 155—174.

San Pietro, A., F. A. Greer, and T. J. Army. 1967. Harvesting the Sun. Photosynthesis in Plant Life. Academic Press, New York and London.

实验 38　戊糖-5-磷酸异构酶

目的

从含有戊糖-5-磷酸异构酶的菠菜叶制备一粗浸提液和用来研究从磷酸化醛糖(核糖-5-磷酸)酶促转变为磷酸化酮糖(核酮糖-5-磷酸)的作用.

材料

50 克菠菜叶;

500 毫升三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)缓冲液(0.1 M,用 HCl 调节到 pH 7.0);

5 毫升核糖-5-磷酸溶液(10 毫克/5 毫升水,重量/容量,用钠盐最好);

20 毫升间苯二酚-盐酸试剂(见书后附录);

组织捣碎机;

薄纱纸;

离心管;

离心机;

5 个试管;

水浴;

Klett 比色计(420 滤光片)或分光光度计(420 毫微米).

步骤

A. 酶的制备

浸提液可在本实验课前制备，制备的量需够分配给每一人或每一组使用.

将50克菠菜叶加200毫升冷的0.1 M三（羟甲基）氨基甲烷缓冲液（pH 7.0）在一组织捣碎机中匀化2分钟. 匀浆通过两层用缓冲液浸湿的薄纱纸过滤. 弃去滤渣，滤液在15000×g离心20分钟. 用得到的上清液作为酶的来源，但在用前需以三(羟甲基)氨基甲烷缓冲液稀释10倍(用几种不同的稀释法较好).

如酶制剂不是立即使用，可将之冷冻，贮存一个短时间.

B. 戊糖-5-磷酸异构酶测定

在5个洁净、干燥的试管上贴上1到5的标签，按照下列顺序向每管加不同的成分(可用表38-1作为最后的检验)：

表 38-1 戊糖-5-磷酸异构酶反应混合物*

储备液	试管号码和加入量(毫升)				
	1	2	3	4	5
Tris缓冲液(0.1 M, pH 7.0)	0.6	0.6	0.6	0.8	0.8
酶制剂	0.2	0.2	0.2（经煮沸过）	—	0.2
核糖-5-磷酸	0.2	0.2	0.2	0.2	—

* 所有混合物均保温15分钟.

1. 移液管移取0.6毫升0.1 M三(羟甲基)氨基甲烷缓冲液到试管1,2和3中；

2. 移液管移取 0.8 毫升 0.1 M 三(羟甲基)氨基甲烷缓冲液到试管 4 和 5 中;

3. 移液管移取 0.2 毫升稀释过的酶液到试管 1,2,3 和 5 中;

4. 在一沸水浴上单独加热试管 3 两分钟,然后置冷水中迅速冷却,如果需要,可加足够量的缓冲液以补充从试管蒸发掉的液体;

5. 加 0.2 毫升核糖-5-磷酸溶液到 1,2,3 和 4 试管中起始反应;

6. 在加入底物后,混匀每管的内含物,在室温下保温 15 分钟.

在保温时间的最后,从一滴定管向每一试管加进 4 毫升间苯二酚-盐酸试剂以终止反应. 振荡试管,将它们放入一保持 75—80°C 的水浴中准确地加热 10 分钟. 然后在冷水中冷却试管,用 Klett 比色计(420 滤光片)或分光光度计(420 毫微米)测量每一混合物的吸收率. 向教师请教仪器的正当用法和校准法,记住要有一个水的空白.

结果和结论

记录读数(Klett 单位或光密度单位)于表 38-2 中.

由于在没有酶的存在下,核糖-5-磷酸转变为核酮糖-5-磷酸的作用也缓慢进行,所以将每个实验的混合物的读数减去含经煮沸酶的混合物(试管 3)的读数来计算酶的活性. 记录下试管 1 和试管 2 的调整值于表 38-2 中.

在总结报告中应当考虑酶制备中所包括的步骤. 例如,要解释为什么用冷 Tris 缓冲液(pH 7.0)作浸提介质?戊糖-5-磷酸异构酶是否是最后浸提液中唯一的酶?为什么在酶测定实验中要包括混合物 4 和 5?

表 38-2 核酮糖-5-磷酸的测定

处理或测量	试管号				
	1	2	3	4	5
间苯二酚-HCl(毫升)	4	4	4	4	4
反应时间(分钟)	10	10	10	10	10
Klett 单位(420 滤光片) 或 光密度(420 毫微米)					
调整值(酶活性)			—	—	—

列出一通式以说明核糖-5-磷酸酶促转变为核酮糖-5-磷酸的作用. 详述此反应是否需要光，还是需要在二氧化碳固定作用中包括的其他的因素? 此反应在呼吸作用和光合作用中的重要性是什么?

阐明用间苯二酚-盐酸试剂检定核酮糖-5-磷酸的作用中包含的反应细节. 此试剂是对核酮糖-5-磷酸的特效检定，还是对一类活泼的化学基团的特效检定? 说明之.

有什么更深入的步骤可用来断然确定在含有这酶制剂的反应混合物中产生核酮糖-5-磷酸?

参考文献

Axelrod, B. and R. Jang. 1954. Purification and properties of phosphoriboisomerase from alfalfa. J. Biol. Chem. 209: 847-855.

Bassham, J. A. 1965. Photosynthesis: The path of carbon. In: J. Bonner and J. E. Varner (Eds.) Plant Biochemistry. Academic Press, New York. p. 888.

Bonner, J. and J. E. Varner. 1965. The path of carbon in respiratory metabolism. In: J. Bonner and J. E. Varner (Eds.) Plant Biochemistry. Academic Press, New York. p. 218.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 255-257.

Dische, Z. and E. Borenfreund. 1951. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.* 192: 583-587.

实验 39　苍耳的光周期

目的

在日照长度敏感的苍耳属（*Xanthium*）植物中研究开花的光诱导.

材料

32 盆苍耳（*Xanthium pennsylvanicum*）植物（生长 60 天）;

保持在恒定光照条件下的温室（或利用可控制光照的培养箱）;

暗室，用黑棉布遮盖的合适的暗盒或者根据处理而盛放植物用的单独不透光的小室.

步骤

A. 苍耳种子萌发与植株生长

对日照长度敏感的苍耳种子可以在当年秋季从美国北部收集来. 但是如果没有苍耳,其他光敏感的植物种子(例如紫花牵牛)也可，这些种子可以从当地商人处得到，并且根据本试验的一般设计来应用. 对苍耳所描述的专门的光照与黑暗处理必需根据所用的植物来改变.

播种前，在 4°C 给苍耳一个冷处理 72 小时，随后把它们浸在蒸馏水中 24 小时. 预处理后，把种子(不需要去掉刺)播

在平坦的沙中，深度约1吋.

当幼苗生长超过沙面约两吋时，把它们移栽到土中(每盆一株幼苗)，使它们保持在连续荧光光照下60天.

B. 对光诱导的临界日照长度

暴露10盆生长60天的苍耳植物(每种处理2盆)在如表39-1所述的光照与黑暗条件下. 光照与黑暗间隔必须严格地坚持五个周期(天)，在这以后将所有的植株放到连续的荧光光照下. 一个实验的植株的数量(每种处理2盆)就足够用以解释，这只有如果全班的人共用所得的结果.

表 39-1 对光诱导的临界日照长度

盆号	光照(小时/周期)	黑暗(小时/周期)	周期数(天)	班的结果*	
				1	2
B-1	10	14	5		
B-2	15	9	5		
B-3	15½	8½	5		
B-4	16	8	5		
B-5	20	4	5		

* 用一个平均值作为班的结果，这是按照叙述在结果部分的方法1与2来测定的.

C. 对开花必需的诱导周期数

暴露12盆生长60天的苍耳植株在如表39-2所述的光照与黑暗周期下.

当植物在试验条件所规定的周期下暴露后，将它们放回到长日条件的光照下.

表 39-2　对开花必需的诱导周期数

盆　　号	光　　照	黑　　暗	周 期 数	班 的 结 果*	
	(小时/周期)	(小时/周期)	(天)	1	2
C-1	24	0	5		
C-2	8	16	1		
C-3	8	16	2		
C-4	8	16	3		
C-5	8	16	4		
C-6	8	16	5		

*　用一个平均值作为班的结果，这是按照叙述在结果部分的方法 1 与 2 来测定的.

表 39-3　光诱导的受体

盆　号	植物的状态	光　　照	黑　　暗	周期数	班的结果**	
		(小时/周期)	(小时/周期)	(天)	1	2
D-1	摘除全部叶片	8	16	5		
D-2	除一片叶外（保留第三片叶)* 摘除全部叶片	8	16	5		
D-3	整株植物	8	16	5		
D-4	整株植物	24	0	5		
D-5	整株植物；用一张不透光的铝箔盖住一片叶子(第三片)每天从上午5:00盖到下午9:00	24	0	5		

*　第三片叶子从中脉基部到顶端的长度必需约 7—9 厘米，并且是从第 1 张最小的，长于 1 厘米的叶片开始以后的第三片最大的叶片.

**　用一个平均值作为班的结果，这是按照叙述在结果 部分的方法 1 与 2 来测定的.

D. 光诱导的受体

暴露 10 盆苍耳植株(每种处理 2 盆)到指示在表 39-3 中的光照与黑暗要求约 5 个周期，然后把所有植株放回到长日照条件下.

结果与结论

苍耳开花的光诱导可以通过下面任何一个方法或者将每



开花阶段	标　准
0	营养生长. 茎端相对扁平和小;
1	首先清楚地看到茎端的膨胀;
2	花原端至少高与宽相等，但基部还没有收缩;
3	花原端基部收缩，但还看不到花原基;
4	首先看到花原基，盖住花原端下部$\frac{1}{4}$处;
5	花原基盖住花原端从$\frac{1}{4}$至$\frac{3}{4}$;
6	花原基盖住所有的部位，除花原端的顶部;
7	花原端完全被花原基盖住，有一点短柔毛;
8	许多短柔毛，并表现出花部的某种分化;至少一厘米基本直径.

图 39-1　开花期与它们顶芽的标准

一处理的重复再分开用两种方法来测定. 班的结果可以共用作为适当的说明.

1. 顶芽开花期的测定:

试验开始后 10 天,在双筒解剖镜下检定每棵植株的芽,根据图 19-1 所给的图解与规格记录发育的阶段.

所用的阶段如指导所指示的,如果观察到中间的阶段,你自己作补充,而且完成全部的工作量,在所给的表中填上班的结果.

2. 每种处理开花植物的百分率:

光诱导后四至五星期, 检查植株并记录每株植物开花的百分率和(或)每种处理开花植株的百分率. 记录整班的结果.

交出你的关于临界日照长度对苍耳开花必需的诱导周期数与光诱导受体的结论.

苍耳被鉴别为短日照的还是长日照的开花植物? 解释你的答案.

除从本试验中所得出的一般结论外, 讲出在长日照与短日照开花植物中与开花发端有关的当前一般的概念.

参考文献

Bonner, J. and J. A. D. Zeevaart. 1962. Ribonucleic acid synthesis in the bud, an essential component of floral induction in *Xanthium*. *Plant Physiol.* 37: 43-49.

Chailakhyan, M. Kh. 1968. Internal factors of plant flowering. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 19: 1-36.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 481-498.

Garner, W. W. and H. A. Allard. 1920. Effect of the relative length of the day and night and other factors in growth and reproduction in plants. *Agric. Res.* 18: 553-606.

Hendricks, S. B. 1964. Photochemical aspects of Plant photoperoidicity. In: A. C. Giese (Ed.) Photophysiology. Academic Press, New

York. pp. 305—331.

Hendricks, S. B. and H. A. Borthwick. 1954. Photoperiodism in Plants. Proc. Intern. Photobiol. Cong. (Ist), pp. 23—35.

Hillman, W. S. 1962. The Physiology of Flowering. Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York.

Hillman, W. S. 1967. The physiology of phytochrome. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **18**: 301—324.

Lincoln, R. G., D. L. Mayfield, and A. Cunningham. 1961. Preparation of a floral initiating extract from Xanthium. *Science* **133**: 756.

Lockhart, J. A. 1961. Mechanism of the photoperiodic process in higher plants. In: W. Ruhland (Ed.) *Encyclopedia of Plant Physiology* **16**: 390—438.

Meyer, B. S., D. B. Anderson and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 470—488.

Salisbury, F. B. 1955. The dual role of auxin in flowering. *Plant Physiol.* **30**: 327—334.

Salisbury, F. B. 1961. Photoperiodism and the flowering Process *Ann. Rev. Plant Physiol.* **12**: 293—326.

Salisbury, F. B. 1963. The Flowering Process. Macmillan Co., New York. pp. 72—92.

Zeevaart, J. A. D. 1962. Physiology of flowering. *Science* **137**: 723—731.

实验 40 燕麦胚芽鞘延长的光可逆控制

目的

表明在燕麦胚芽鞘中与生长反应有关的一种光敏色素的红光、远红光、光可逆控制作用.

材料

130 株燕麦(*Avena sativa* L. 'Clintland') 幼苗 (3 天大小);

40 毫升 0.1 M 磷酸缓冲贮备液 (10.9 克 KH_2PO_4 与 2.8 克 Na_2HPO_4 溶解在蒸馏水中并稀释到 1 升);

1.5 克蔗糖;

12 个烧杯(50 毫升);

12 片铝箔(每片 3 吋见方);

刀片;

米尺(毫米);

小铲或镊子;

红光光源(见书后附录);

远红光光源(见书后附录);

解剖显微镜.

步骤

A. 幼苗的制备

浸大约 50—75 毫升燕麦种子到两倍于它们体积的含有0.05%Tween-20(容量/容量)的蒸馏水中 30 分钟. 当种子吸涨时,将大约 150 克蛭石盛在一个塑料盘内(约12×8×4吋). 用 600 毫升水湿润蛭石,并彻底混合.

当种子准备播种时,吸干种子,把它们均匀地撒在蛭石的表面. 盖住盘以防止蒸发,并将它放在一个 25°C 的暗室内. 幼苗将在播种 72 小时后准备应用.

B. 蔗糖-缓冲介质

用蒸馏水稀释 40 毫升贮备的缓冲液(0.1 M磷酸缓冲液)到 200 毫升. 稀释了 5 倍的溶液pH约为 6.0—6.4. 溶解 1.5 克蔗糖到 100 毫升的稀缓冲液中. 分别将 5 毫升蔗糖缓冲液装在 12 个烧杯中,用铝箔盖住烧杯.

C. 胚芽鞘切段切取、照射与培养

下面全部步骤包括植物材料的处理必须在黑暗中完成或者在暗绿色的安全灯下完成.

在暗室中(那里生长着幼苗)工作在一个暗绿色的安全灯下,从 130 株幼苗上切割下胚芽鞘的顶端 5 厘米. 要完成这个步骤,首先从蛭石上拔出少量幼苗,除去多余的蛭石并且用你的手指将幼苗分开,将幼苗放到毫米尺上,将顶部放在相当的记号上,用刀片在胚芽鞘顶下 5 毫米处切断,如每 5 毫米段切完了,把它放在一个开口的培养皿中,其中含有一些没有蔗糖的稀释的缓冲液,每一株幼苗只切一段.

当你已收集了130段，在12个烧杯中，每杯放10段，根据下面的设计照射这些段.

1. 暴露烧杯3,4,7,8,9,10,11,12在红光下5分钟;

2. 暴露烧杯从5至12在远红光下5分钟;

3. 暴露烧杯从9至12在红光下5分钟;

4. 暴露烧杯11和12在远红光下5分钟.

当单一光处理时，一定要使那些不照光的烧杯保存在完全黑暗下(在抽屉里或不透光的盒子里). 当最后的光处理完，再把所有的烧杯盖上，并且把它们保存在完全黑暗中过夜(最好约18—20小时).

用解剖镜测定保存在培养皿中10段的长度，并测定它们的长度接近到0.5毫米. 这个步骤可以在试验室内完成. 平均10段的长度，记录此值作为这些段最初的长度.

D. 照射与培养后切段的测量

当处理的与对照的切段在归定的时间内培养后，把它们放到试验室并用解剖镜来测量. 根据下面的公式测定每一种处理的生长增量:

$$生长增量=L_2-L_1$$

这里L_2表示在培养后每一组试验切段的长度，而L_1表示从10段开始试验时所测定的平均长度(L_1在所有计算中取同一数值).

根据表40-1所指的步骤，计算每个处理的总的与平均生长增量和标准误差.

测量与计算:

结果和结论

除表40-1外，用曲线来说明结果，在纵坐标上指出平均

表 40-1 平均生长增量的标准误差

差数	符号	测定	处理号码											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
每处理切段的数量	N	—	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
生长增量（毫米）的总和	$\sum x$	$\sum x = x + x \cdots\cdots$；等												
生长增量的平均值/处理	$\bar{x}$	$\bar{x} = \frac{\sum x}{N}$												
单个生长增量平方的总和	$\sum(x^2)$	$\sum(x^2) = x^2 + x^2 + x^2 \cdots\cdots$；等												
增量平方的总和	$(\sum x)^2$	$(\sum x)^2 = (\sum x)(\sum x)$												
校正因素	CF	$CF = \frac{(\sum x)^2}{N}$												
从平均平方值得的单个生长增量的总和	$\sum X^2$	$\sum X^2 = \sum(x^2) - CF$												
平均标准误差	$S_{\bar{X}}$	$S_{\bar{X}} = \sqrt{\frac{\sum X^2}{N(N-1)}}$												

生长增量，对着横坐标上不同光处理.

根据光敏色素对红光与远红光的可逆反应，解释你的关于生长反应方面的结果.

参 考 文 献

Hillman, W. S. 1967. The physiology of phytochrome. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **18**: 301—324.

Hopkins, W. G. and W. S. Hillman. 1965. Phytochrome changes in tissues of darkgrown seedlings representing various photoperiodic classes. *Amer. J. Botany* 52: 427—432.

Hopkins, W. G. and W. S. Hillman. 1965. Response of excised Avena coleoptile segments to red and far-red light. *Planta* **65**: 157—166.

试验 41　激动素与光对莴苣种子萌发的影响

目的

观察激动素、红光与远红光对黑暗中莴苣种子萌发的影响.

材料

350 粒莴苣种子 (*Lactuca sativa* L. 'Grand Rapids');
2 种激动素溶液(2 毫克/升与 10 毫克/升; 重量/容量);
7 个培养皿[每皿盛有 3 片(9 厘米)滤纸];
铝箔(或黑棉布);
暗室;
2 个小硬纸板盒(任何不透光的容器,可置放与运送培养皿);
绿色安全灯(见书后附录);
红色光源(见书后附录);
远红光光源(见书后附录).

步骤

A. 植物材料

为了保证有一个比较均匀的萌发反应,试验前将干的莴苣种子(*Lactuca sativa* L. 'Grand Rapids')培养在 35—37°C

下 3 天.

B. 种子的化学与光处理

将贴好标签的 7 个培养皿每个都填上滤纸 3 张（9 厘米），随后，根据表 41-1 每个皿中加 5 毫升水或激动素溶液，每皿播上 50 粒莴苣种子. 盖上培养皿并用铝箔或黑棉布包上. 为了得到成功的结果，吸涨的种不能暴露在任何光下，除非有另外的说明. 在每个培养皿上贴上纸条作记号（根据你自己的记号系统），因而在暗室的绿色安全灯下能分辨出每个培养皿来.

表 41-1 激动素、红光和远红光对莴苣种子萌发的影响*

培养皿号码	试验溶液（毫克/升）	光处理	种子萌发数	萌发百分数（%）
1	水	无		
2	激动素（2）	无		
3	激动素（10）	无		
4	水	红（8 分钟）		
5	水	红（8 分钟）接着远红（8 分钟）		
6	水	远红（8 分钟）		
7	激动素（10）	远红（8 分钟）		

* 每个培养皿播 50 粒种子.

培养皿 1,2 与 3 放在一个容器内，将它们在整个试验期间（48 小时）都保存在黑暗中. 培养皿 4—7 放在另一个容器内，叠起来从底到顶部的次序为 7,6,5 和 4.

将两个容器都保存在黑暗中，而后开始的全部操作必须在黑暗中完成. 下列过程能够在绿色安全灯下操作，必须注意即使暗绿色的光也将促进激动素对莴苣种子的萌发作用（Miller, 1958）.

在浸泡最后16小时的时候，将皿4与皿5从盒子里取出来，在黑暗中打开盖子，然后把种子暴露在红光下8分钟.

红光照射后，单把培养皿4盖起来，再包好. 在同样情况下，将皿5,6和7中的种子暴露在远红光下8分钟. 再将所有的培养皿放回到完全黑暗中直到试验完毕.

从实验开始到48小时结束时，拆开所有的培养皿，并且在试验室中计算每个培养皿中萌发种子的数目. 在表41-1中记录每种处理的种子萌发数目与百分数. 因为激动素在所用的浓度中抑制胚根延长，凡是一粒种子的胚的任何部分突破种皮，可以看作是萌发.

结果和结论

将你的报告结果填在表41-1中，并且用一个适当的线型图来表示出各种激动素以及光照处理与萌发百分数的关系. 为了统计，汇总全班的结果，将得到更多的资料.

关于在黑暗中激动素、红光与远红光对莴苣萌发的效应，用文字说明作一个讨论.

应考虑到包含在光效应中的色素系统以及任何可能的机制包含着激动素对莴苣种子萌发的作用.

参 考 文 献

Borthwick, H. A., S. B. Hendricks, M. W. Parker, E. H. Toole, and V. K. Toole. 1952. A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Nat. Acad. Sci U. S.* 38: 662—666.

Borthwick, H. A., S. B. Hendricks, E. H. Toole, and V. K. Toole. 1954. Action of light on lettuce seed germination. *Bot. Gaz.* **115**: 205—225.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 523—527.

Flint, L. H. and E. D. McAlister. 1937. Wavelengths of radiation in the visible spectrum promoting the germination of light sensitive

lettuce seed. Smithsonian *Inst. Publs. Misc.: Coll.* **96**: 1—8.

Hendricks, S. P. 1964. Photochemical aspects of plant photoperiodicity. In: A. C. Giese (Ed.) Photophysiology. Academic Press, New York. pp. 305—331.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 510—528.

Miller, C. O 1956. Similarity of some kinetin and red-light effects. *Plant Physiol.* 31: 318—319.

Miller, C. O. 1958. The relationship of the kinetin and red-light promotions of lettuce seed germination by 6-(substituted) thiopurines. *Arch. Biochem. Biophys.* 65.

Skinner, C. G., J. R. Claybrook, F. D. Talbert, and W. Shive. 1956. Stimulation of seed germination by 6-(substituted) thiopurines. *Arch. Biochem. Biophys.* **65**: 567—569.

Toole, E. H., S. B. Hendricks, H. A. Borthwick, and V. K. Toole. 1956. Physiology of seed germination. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 7: 299—324.

Withrow, R. B. (Ed.) 1959. Photoperiodism and Related Phenomenon in Plants and Animals. *Amer. Inst. for the Advancement of Sci. Washington, D. C.* **55**: 89.

实验 42 化学物质对莴苣种子萌发的作用

目的

测定各种化学物质对莴苣种子发芽的作用.

材料

450 粒莴苣 (*Lactuca sativa* L. 'Grand Rapids') 种子;
9 套培养皿(垫着滤纸圆片);
7 支移液管(5 毫升,刻度的);
下列水溶液:
香豆素(5 毫克/100 毫升),
硫脲(125 毫克/100 毫升),
尿素(125 毫克/100 毫升),
放线菌素D(5 毫克/100 毫升),
2,4-滴(7 毫克/升),
2,4-二硝基酚(125 毫克/100 毫升);
2个定温箱(调节在 20°C和 32°C).

步骤

(实验前将种子在 37°C 下贮存 3 天, 可以保证有比较均一的发芽).

在培养皿上标记上号码 1—9,并在每一培养皿的底部放一张滤纸圆片. 然后在每一皿中放 50 粒 莴 苣种子并用移液

管移入4毫升下列溶液:

培养皿	溶液及浓度
1	蒸馏水
2	香豆素(5毫克/100毫升)
3	硫脲(125毫克/100毫升)
4	尿素(125毫克/100毫升)
5	放线菌素D(5毫克/100毫升)
6	2,4-滴 (7毫克/升)
7	2,4-二硝基酚(194毫克/升)
8	蒸馏水
9	硫脲(125毫克/100毫升)

使种子吸涨溶液30分钟并用红光照射(可用两层红玻璃纸包在一个红色荧光灯上).

将培养皿1—7号放在20°C的定温箱中. 把8—9号放在32°C定温箱中. 种子发芽17—24小时后, 统计每一培养皿中种子发芽的数目.

结果和结论

将得到的数据填在表42-1中.

表42-1 莴苣种子发芽情况

培养皿	播入的种籽数目	发芽的种籽数目	发芽百分数	抑制百分数
1	50			
2	50			
3	50			
4	50			
5	50			
6	50			
7	50			
8	50			
9	50			

在结论中评价和解释从这个实验中得到的数据．倘若要统计以上的结果，可使用全班同学的实验结果．

参 考 文 献

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York, pp. 515-540.

Koller, D. 1959. Germination. *Sci. Amer.* **200** (4):75-84.

Koller, D., A. M. Mayer, A. Poljakoff-Mayber, and S. Klein. 1962. Seed germination. *Ann. Rev. Plant Physiol* **13**:437-464.

Mayer, A. M. and A. Poljakoff-Mayber. 1963. The Germination of Seeds. Macmillan Co., New York.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 510-528.

Thompson, R. C. and W. F. Kosar. 1938. The germination of lettuce seed stimulated by chemical treatment. *Science* **87**:218-219.

Varner, J. E. 1965. Seed development and germination. In: J. Bonner and J. E. Varner (Eds.) Plant Biochemistry. Academic Press, New York and London. pp. 763-792.

实验 43 向 光 性

目的

表明燕麦胚芽鞘的顶尖和吲哚乙酸对于燕麦胚芽鞘的向光性的影响.

材料

70 粒燕麦种子(*Avena sativa* L. 'Victory'),常用的品种大多数均可用来作实验. 但是,晚熟的品种如胜利、二十世纪、小仔猪和白俄罗斯,更敏感一些;

100 毫升 Tween-20 水溶液(0.05%,容量/容量);

2 个玻璃缸(底部铺一层湿棉花);

铝箔套(5 毫米长);

2 个硬纸盒(大小要能放入 1 个玻璃缸);

定距刀片(2 个双面刀片,刀片的一面嵌入一个软木塞内,2 刀片相隔一已知距离);

吲哚乙酸羊毛脂(1%,重量/容量);

光源(40 瓦灯泡).

步骤

A. 种子萌发

70粒燕麦种子在为其体积两倍的蒸馏水中浸泡 60 分钟,蒸馏水中加入 0.05%Tween-20(容量/容量). 将 30 粒浸泡

过的种子播入玻璃缸(1号)底部的湿棉花上，剩余的40粒种子播入另一个底部也有一层湿棉花的玻璃缸(2号)内．把玻璃缸盖好，放入暗室或小室内，保持黑暗，直到胚芽鞘高约2厘米．

B. 向光性与胚芽鞘顶尖

在暗室内微弱红光下处理1号玻璃缸内的胚芽鞘，处理如下（没有暗室时，可以在实验室内非常微弱的光下进行操作）：

10个胚芽鞘的顶尖用铝箔作的5毫米长的小套套上；

将10个胚芽鞘的顶尖切去2—3毫米，其余的10个胚芽鞘保持完整；

盖好玻璃缸，放入硬纸盒一端近中心的部位，硬纸盒内涂成黑色，硬纸盒用胶纸带封好，使光线不能透入；

在硬纸盒没有放玻璃缸的一端，距底10厘米高处，挖一小洞(面积约为1平方厘米)，调节硬纸盒的位置，使光线通过小洞进入硬纸盒内；

连续单侧光处理48小时后，打开硬纸盒，检查胚芽鞘，观察胚芽鞘的位置与入射光的关系．

观察：

C. 吲哚乙酸(IAA)在向光性上的作用

全部操作在暗室中红光下进行．如果没有暗室，可在微弱光线下，快速进行以下操作．

将30个胚芽鞘每个顶尖切去2—3毫米．用1%IAA羊

毛脂(重量/重量)涂在 10 个切去顶尖的胚芽鞘的一侧，从顶端一直涂到基部(涂药的一侧，背离单侧光)．用同样方法，把 IAA 羊毛脂涂在 10 个切去顶尖的胚芽鞘向光的一侧．10 个切去顶尖的胚芽鞘不涂药．留 10 个整体幼苗．

与 B 项相同，把玻璃缸放入硬纸盒内，使幼苗暴露在单侧光下．光处理 48 小时后，打开硬纸盒，检查胚芽鞘．记录胚芽鞘的位置与入射光的关系．

观察：

结果和结论

用表格表明实验结果并对向光性的生长素理论作出评价．是否这一理论是所有向光性反应的一种适当的解释？

参 考 文 献

Darwin, C. 1881. The Power of Movement in Plants. The Appleton Co., New York.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 401-408.

Laetsch W. M. and R. E. Cleland (Eds.) 1967. Papers on Plant Growth and Development. Little, Brown and Co., Boston.

Leopold, A. C. 1964. Plant Growth and Development. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand and Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 381-390.

Steward, F. C. 1968. Growth and Organization in Plants. Addison-Wesley Publ. Co., Reading, Massachusetts.

Went, F. W. and K. V. Thimann. 1937. Phytohormones. Macmillan Co., New York.

实验 44 向 地 性

目的

用玉米幼苗研究向地性及根尖的功能.

材料

50—60 个萌发的玉米种子(见步骤 A 项);
广口瓶;
纱布;
2 个电池用玻璃缸;
土壤(能装满两个电池用玻璃缸的量);
铝箔.

步骤

A. 种子萌发

将 50—60 粒玉米种子装入一个广口瓶,用自来水浸泡数小时. 倒去瓶中的水,用自来水冲洗几次,再用几层纱布把瓶口盖住,用细绳扎紧. 然后,把瓶子倒置在水槽内,使它不直接受到阳光. 每天用自来水冲洗数次,直到有些胚芽鞘长到 1—2 厘米长. 一部分种子继续处理一段时间,使幼苗的根长到 3 厘米左右.

B. 向地性

电池用玻璃缸内装入半缸湿土，播入 20 粒萌发种子(胚芽鞘长 1—2 厘米). 要能透过玻璃看到根尖和胚芽鞘. 种子以不同方式放置在土壤上,使三分之一的种子的根向下;三分之一的根向上;其余的种子根横着放.

播好后,盖上湿土,放置在漫射光下. 玻璃缸外面用铝箔包好;每次观察后，仍然包好. 在植物生长过程中，观察根及胚芽鞘的表现.

观察:

C. 根尖和向地性弯曲

选择高约 3 厘米带根的玉米苗 20 株，将 10 株玉米苗的根尖 2 毫米（用锋利的刀片）切去. 玻璃缸内装入半缸湿砂，把幼苗摆在玻璃缸壁与湿砂之间，把根沿水平方向放好;10 株完整幼苗（根长 3厘米）也以同样方式放好,用湿砂装满玻璃缸. 玻璃缸用铝箔包好,每次观察后,仍需包好.

几天之内随时观察根尖的表现.

观察:

结果和结论

叙述整体幼苗和去根尖的幼苗，在生长上有些什么差

异？解释根尖与生长素在向地性中的作用的主要理论是什么？

参 考 文 献

Audus, L. J. 1959. Plant Growth Substances, 2nd ed. L. Hill, London.

Darwin, C. 1881. The Power of Movement in Plants. The Appleton Co., New York.

Haberlandt, G. 1913. Zur Physiologie der Zellteilung. Stiz. ber. k. preuss Akad. Wiss. pp. 318-345.

Leopold, A. C. 1964. Plant Growth and Development. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York. pp. 164, 168-173.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. pp. 389-391.

Steward, F. C. 1968. Growth and Organization in Plants. Addison-Wesley Publ. Co., Reading, Massachusetts. pp. 125, 163.

Went, F. W. and K. V. Thimann. 1937. Phytohormones. Macmillan Co., New York.

实验 45　燕麦胚芽鞘切段试法
（生物鉴定的基本方法）

目的

说明用于生长素的一种生物鉴定的技术，并研究吲哚乙酸对于燕麦胚芽鞘切段生长的作用.

材料

50 棵燕麦幼苗(*Avena sativa* L. ‘Victory’) 生长在黑暗之中，并在预定的实验课以前准备好（见步骤 A 项)；

100 毫升次氯酸钠溶液（1%)；

100 毫升含有 2%（重量/容量） 蔗糖的 KH_2PO_4 （0.01 M） 缓冲液（pH 4.5)；

暗室(25—26°C和大约 85%的相对湿度)；

灯(配有 10 瓦的红灯泡)；

10 个培养皿；

切段的工具(由互相平行、间隔为 6 毫米宽的两个刀片做成)；

镊子；

10 片显微镜载片；

解剖镜；

尺(刻度到 0.1 毫米).

步骤

A. 种子萌发和幼苗生长

60 粒燕麦种子(*Avena sativa* L. 'Victory')在 1%次氯酸钠溶液中消毒 5 分钟. 用水彻底的漂洗之后，把种子浸泡在无菌水中约 1 小时.

将消毒种子播种在有蛭石的盘中，在黑暗中生长，温度 25°C，相对湿度约 85%. 为了提高幼苗对于生长素的敏感性，幼苗也可以在连续的低强度的红光下萌发(用10 瓦的红灯泡).

B. 胚芽鞘切段试验(切段的操作必须在暗室中微弱的红光下进行)

在种子播种 72 小时之后(胚芽鞘长度约 25—30 毫米)，用切段工具制备 50 个胚芽鞘的尖端下面的切段(6毫米长). 每一切段上部的切面距所选择的胚芽鞘尖正好 3 毫米.

切后立即将切段放入含有 2 %(重量/容量)蔗糖的 0.01 M KH_2PO_4 缓冲液(pH 4.5)中. 这个溶液以后就为基本培养基. 将切段浸泡在基本培养基中至少 1 小时，洗去内源的生长素. 浸泡后，在装有 20 毫升下列试验溶液(共两组)的每一个培养皿中放 5 个切段:

1. 基本培养基;
2. 基本培养基+IAA(10^{-7}M);
3. 基本培养基+IAA(10^{-6}M);
4. 基本培养基+IAA(10^{-5}M);
5. 基本培养基+IAA(10^{-4}M).

切段在溶液里黑暗培养 10 小时后，测量一组切段的长

度．培养20小时之后，测定另一组切段的长度．

将每一个处理的切段移到载玻片上，加一滴培养液，使它不至干燥．用配有目镜测微尺的解剖镜或用具刻度的厘米尺测量切段的长度，精确到约0.1毫米．

观察：

结果和结论

求出每个处理的切段的平均长度，包括培养在只有基本培养基(对照)的切段的平均长度．为了测定生长素所引起的生长的量，从生长素处理的切段的平均长度中减去对照切段的平均长度．将增长的长度对着生长素浓度的对数绘一条剂量反应曲线．

总结报告应讨论IAA对于胚芽鞘切段生长的作用以及本试验的专一性和灵敏度．

参 考 文 献

Audus, L. J. 1959. Plant Growth Substances, 2nd ed. L. Hill, London.

Bentley, J. A. 1950. An examination of a method of auxin assay using the growth of isolated sections of Avena coleoptiles in test solutions. *J. Expt. Bot.* 1:201-13.

Bentley, J. A. 1962. Analysis of plant hormones. In: D. Glick (Ed.) Methods of *Biochemical Anal.* 9:75-125.

Bentley, J. A. and S. Housley. 1954. Bio-assay of plant growth hormone. *Physiol. Plantarum* 7:405-420.

Bonner, J. 1933. The action of the plant growth hormone. *J. Gen. Physiol.* 17: 63.

Crosby, D. G., R. V. Berthold, and R. Spencer, Jr. 1961. Naturally occurring growth substances. II. An improved straight

growth test and its application. *Plant Physiol.* **36**:48-51.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 420-421.

Leopold, A. C. 1964. Plant Growth and Development. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.

McRae, D. H. and J. Bonner. 1953. Chemical structure and antiauxin activity. *Physiol. Plantarum* **6**:485-510.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey.

Mitchell, J. W. and Livingston, G. A. 1968. Methods of studying plant hormones and growth-regulating substances. Agric. Handbook No. 336, U. S. D. A. pp. 23—25.

Nitsch, J. P. and C. Nitsch. 1956. Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxin. *Plant Physiol.* **31**: 94—111.

Schneider, C. L. 1938. The interdependence of auxin and sugar for growth. *Amer. J. Botany* 25: 258—270

Sirois, J. C. 1966. Studies on growth regulators. I. Improved Avena coleoptile elongation test for auxin. *Plant Physiol.* **41**: 1308—1312.

Van Overbeek, J. 1959. Auxins. *The Botanical Rev.* 25(2): 269—350.

Went, F. W. and K. V. Thimann. 1937. Phytohormones. Macmillan Co., New York.

实验 46 劈开的豌豆茎弯曲试法
（生物鉴定的基本方法）

目的

研究生长素生物鉴定的另一种方法，并说明劈开豌豆茎不同的生长反应.

材料

30 棵豌豆幼苗（*Pisum sativum* L. 'Alaska'，生长在黑暗中 8—10 天，见步骤 A 项）；

4 种浓度的吲哚乙酸溶液（每种 30 毫升，IAA 浓度：10^{-2}M，10^{-4}M，10^{-5}M，10^{-6}M）；

暗室（温度约 25—28°C）；

红光（10 瓦红灯泡）；

1 个烧杯（80 毫升）；

5 个培养皿；

刀片（双刀片的切段工具，可以由两把互相平行和相距一个所需宽度的刀片做成）.

步骤

A. 植物材料的准备（在实验课之前完成）

豌豆种子（*Pisum sativum* L. 'Alaska'）在流动的自来水中浸泡 6 小时，然后把种子播种在砂盘中，放在完全黑暗中约 8—10 天. 幼苗一定要按期浇水.

B. 切段

在实验室中收获幼苗，从第三节顶端以下切下均一的切段(大约 30 个,3—4 厘米长).

用刀片劈开每一切段(约向下劈开全长的¾)，放入蒸馏水中,浸泡约 30 分钟,以除去内源生长素.

C. 劈开的豌豆茎切段对于吲哚乙酸的反应

将 5 个劈开的茎切段放入盛有 20 毫升下列溶液的培养皿中(每一种溶液调整到 pH 5.0)：

1. 蒸馏水；
2. IAA(10^{-2}M)；
3. IAA(10^{-4}M)；
4. IAA(10^{-5}M)；
5. IAA(10^{-6}M).

假如时间允许，教师可以另选几种合成生长素或其他生长物质(激动素、赤霉素) 进行试验．生长素浓度应在 10^{-2}M 和10^{-6}M 之间.

所有试验溶液中的切段在黑暗中培养 6 小时，然后观察结果．由于在 6 小时之后初始反应没有明显的变化，假如需要,切段可以培养更长的时间.

观察：

结果和结论

将你对培养在蒸馏水和各种生长素溶液中的切段的观察

绘图表示．定量的估计也是可能的．假如有制做影像用的设备，可按某些文献所述的技术进行．

在总结报告中讨论反应的性质和试验的理论基础．

参 考 文 献

Audus, L. J. 1959. Plant Growth Substances, 2nd ed. L. Hill, London.

Kent, M. and W. A. Gortner. 1951. Effect of pre-illumination on the response of split pea stems to growth substances. *Bot. Gaz.* **112**: 307—311.

Mitchell, J. W. and G. A. Livingston. 1968. Methods of Studying Plant Hormones and Growth-Regulating Substances. Agric. Handbook No. 336. U. S. D. A. pp. 32—34.

Thimann, K. V. and C. L. Schneider. 1938. Differential growth in plant tissues. Amer. J. Bot. 25: 627—641.

Went, F W. 1937. On the pea test method for auxin, the plant growth hormone. K. Akad. Wetenschap. Amsterdam Proc Sect Sci. 37: 547.

Went, F. W. and K. V. Thimann. 1937. Phytohormones. Macmillan Co., New York.

实验 47 豌豆上胚轴的吲哚乙酸氧化酶

目的

从豌豆幼苗的上胚轴提取吲哚乙酸氧化酶并研究吲哚乙酸在离体条件下的酶促分解.

材料

100 棵生长在完全黑暗中 7—9 天的豌豆幼苗 (*Pisum sativum* L. 'Alaska') (见步骤 A 项);

100 毫升磷酸-柠檬酸缓冲液 (用等体积的 0.2 M Na_2HPO_4 和 0.1M 柠檬酸;pH 调整到 5.6);

10 毫升吲哚乙酸溶液(200 微克/毫升);

40 毫升丙酮;

$FeCl_3$ 溶液(0.5 M);

$HClO_4$ 溶液(35%,重量/容积);

6 个三角烧瓶(25 毫升);

6 个试管;

1 个试管架;

纱布;

离心机(如有可能,用冰冻离心机);

6 个比色管或比色杯;

分光光度计(波长用 540 毫微米或配有 No. 54 滤光片的 Klett-Summerson 光电比色计).

步骤

A. 植物材料（生长 7—9 天的幼苗）

豌豆种子 (*Pisum sativum* L. 'Alaska')在流动的自来水中浸泡 4—6 小时，把浸泡过的种子播种在有蛭石或砂的盘中，在黑暗中生长 7—9 天.

B. 酶的制备

从暗中生长的幼苗上取大约 32 克(鲜重)黄化上胚轴，用冷却的匀浆器 (Ten Broeck 或其他玻璃组织研磨器) 或大研钵加极少的冷蒸馏水制成匀浆.

匀浆用一层纱布过滤，滤液在10000×g 下离心 15 分钟. 取上清液并加入足量的丙酮，使最终的丙酮浓度占体积的 40%. 沉淀中含有酶.

将上述溶液在 600×g 离心 15 分钟. 弃去上清液，将沉淀重新悬浮在 8 毫升的缓冲液中(pH 5.6). 每毫升酶制备液代表 4 克鲜重的组织. 这种酶的制备液可以冰冻贮藏（不超过 3 个星期）或立即使用.

C. IAA 氧化酶反应

为完成 IAA 氧化酶活性的简单试验，按照表 47-1 所列的量把母液加入 25 毫升的三角烧瓶中.

在反应开始前不加酶. 3 号烧瓶中用在沸水浴中加热 15 分钟的酶；加过热的酶液用缓冲液调整到原体积，用前冷却到室温.

加入酶使反应开始. 然后缓慢地振荡每一个烧瓶使内含物混合，混合物在室温下放置 50 分钟.

表 47-1 IAA 氧化酶反应混合物

母液	加入量（毫升）					
	管号					
	1	2	3	4	5	6
缓冲液(pH 5.6)	9.0	9.0	8.0	8.0	7.0	6.0
IAA(200微克/毫升)	0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
酶制备液	1.0	0	1.0（煮沸的）	1.0	2.0	3.0
总体积	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0

D. Salkowski 试法和残留 IAA 的测定

在培养期间（C 项的混合物），按反应混合物记下 6 个试管的号数．然后，在每试管中加入 8 毫升 Salkowski 试剂（1毫升 0.5M $FeCl_3$ 加到50毫升 35% $HClO_4$ 中——小心：高氯酸是有腐蚀性的！）.

50分钟后终止酶促反应．每种反应混合液各吸取 4 毫升加入到有 Salkowski 试剂的相应地标记的试管中，小心地将内含物混合（小心：高氯酸！）．试管在室温中静止 30 分钟，保证充分地进行颜色反应.

在 30 分钟之后，将每个管的内含物倒入比色杯中，用配有 No. 54 滤光片的 Klett-Summerson 光电比色计或用Spectronic 20分光光度计在 540 毫微米下比色测定残留的 IAA。

比较含有活性的酶（4,5 和 6）的反应混合液和无活性的酶（烧瓶第 3 号）的反应混合液所得的 Klett 单位或光密度单位数值，计算 IAA 破坏的量.

如果愿意，还可以增加实验（用上述的基本步骤）去研究时间、底物浓度或 pH 对反应速度的影响.

结果和结论

在表 47-2 中记录实验的结果．总结报告中，解释所得的实验结果，讨论酶的制备（例如，为什么用在黑暗中生长的幼

表 47-2　IAA 氧化酶活性

反应混合物* 烧瓶号	光密度或 Klett 单位	残留 IAA （微克）	破坏的IAA （微克）
1			
2		200	
3			
4			
5			
6			

* 反应混合物由表 47-1 所述的各种组分并加入酶之后在室温下培养 50 分钟．

苗作为酶的来源？）和酶的测定的一般步骤。用 Salkowski 试法测定残留的 IAA 的好处和局限性是什么？另外，陈述某些与此酶的性质有关的现代观点和 IAA 在活体内和离体的酶促分解的作用机制．

参 考 文 献

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 452—53, 468.

Galston, A. W. 1967. Regulatory systems in higher plants. Amer. Scientist 55: 144.

Galston, A., J. Bonner, and R. J. Baker. 1953. Flavoprotein and peroxidase as components of the indoleacetic acid oxidase system of Peas. Arch. Biochem. Biophys. 42: 456—470.

Galston, A. W. and L. Y. Dalberg. 1954. The adaptive formation and physiological significance of indoleacetic acid oxidase. Amer. J. Bot. 41: 373—380.

Gordon, S. A. 1954. Occurrence, formation, and inactivation of

auxin. Ann. Rev. Plant Physiol. 5: 341—378.

Gordon, S. A. and R. P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiol. 26: 192—195.

Larsen, P. 1951. Formation, occurrence, and inactivation of growth substances. Ann. Rev. Plant Physiol. 2: 169.

Lipetz, J. and A. W. Galston. 1959. Indoleacetic acid oxidase and peroxidase in normal and crown-gall tissue cultures of parthenocissus tricuspidata. Amer. J. Bot. 46: 193—196.

Maclachlan, G. A. and E. R. Waygood. 1956. Kinetics of the enzymatically catalyzed oxidation of indoleacetic acid. Can. J. Biochem. Physiol. 34: 1233—1250.

Meyer, B. S., D. B. Anderson, and R. H. Böhning. 1960. Introduction to Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey. P. 381.

Platt, R. S., Jr. and K. V. Thimann. 1956. Interference in Salkowski assay of indoleacetic acid. Science 123: 105—106.

Rabin, R. S. and R. M. Klein. 1957. Chlorogenic acid as a competitive inhibitor of indoleacetic acid oxidase. Arch. Biochem. Biophys. 70: 11—15.

Ray, P. M. 1958. Destruction of auxin. Ann. Rev. Plant Physiol. 9: 81—118.

Siegel, B. Z. and A. W. Galston. 1967. Indoleacetic acid oxidase activity of apoperoxidase. Science 157: 1557—1559.

Tang, Y. W. and J. Bonner. 1947. The enzymatic inactivation of indoleacetic acid. I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. Arch. Biochem. 13: 11—25.

Wagenknecht, A. C. and R. H. Burris. 1950. Indoleacetic acid inactivating enzymes from bean roots and pea seedlings. Arch. Biochem. 25: 30—53.

Waygood, E. R., A. Oaks, and G. A. Maclachlan. 1956. On the mechanism of indoleacetic acid oxidation by wheat leaf enzymes. Can J. Bot. 34: 54—59.

Yamazaki, I. and H. Souzu. 1960. The mechanism of indoleacetic acid oxidase reaction catalyzed by turnip peroxidase. Arch. Biochem. Biophys. 86: 294—391.

实验 48　赤霉酸和植物生长

目的

研究赤霉酸对植物生长的影响.

材料

20 株豌豆幼苗 (*Pisum sativum* L. 'Little Marrel', 见步骤 A 项);

30 株菜豆(*Phaseolus vulgaris* L. 'Pinto', 每盆 5 株,见步骤 A 项);

赤霉酸 (GA) 溶液 (100 毫克/升,将 GA 溶于 1—2 毫升 95%酒精中并以水稀释至 1 升);

5 种不同浓度的 GA 溶液(每种溶液 10 毫升):

GA 10^{-1}M　(0.01×GA 的克分子量溶于 1 毫升酒精中以水稀释至 100 毫升),

GA10^{-2}M (1 毫升 10^{-1}M GA 以水稀释至 10 毫升),

GA10^{-3}M (1 毫升 10^{-2}M GA 以水稀释至 10 毫升),

GA10^{-4}M (1 毫升 10^{-3}M GA 以水稀释至 10 毫升),

GA10^{-5}M (1毫升 10^{-4}M GA 以水稀释至 10 毫升);

1000 毫升含有 1—2 毫升 95%酒精的蒸馏水;

装有蛭石的盘;

塑料布(为遮盖植物之用);

米尺.

步骤

A. 植物材料

根据下面操作的说明取用高株品种和矮生品种的菜豆、玉米或豌豆植株．下述的步骤初步作为说明赤霉酸对植物生长影响的工作指南．

1．矮生豌豆幼苗(2 周龄)：在装有蛭石的盘中播上二行矮生豌豆种子(*Pisum sativum* L.)，每行至少播 10 粒种子．种子以½吋的蛭石覆盖，将盘放入温室二周并经常浇水．依照 B 项所述处理二周龄的植株．

2．盆栽菜豆植株 (2—3 周龄)：6 个装有土的盆中播上菜豆种子(*Phaseolus vulgaris* L.)，每盆至少种 5 粒．覆盖½吋的土壤，浇上水并放入温室中 2—3 周．在准备使用时，每盆中选留 2 株，使 6 盆中所有的植株大小一致．没有用的植株齐地面割去．依 C 项所述处理盆栽植株(每盆 2 株)．

B. 赤霉酸处理及植物的生长反应

用塑料罩罩住一行二周龄的豌豆植株，而另一行用GA溶液喷洒(100 毫克/升)，干后罩住处理的一行，用含有和制备 GA 溶液用的同量酒精的蒸馏水喷洒第一行．

植株仍放在温室里，在以后的 3—4 周内记录出现的一切差异．每周至少测三次株高(从地面起)、节间长、叶长(从中脉基部到叶尖）和叶宽．在每周末，再如第一次一样喷洒植株．记住要计算对照和处理植株每次测量的平均值．

观察和测量：

C. 用赤霉酸处理茎尖的作用

根据下列处理标记上盆栽菜豆植株(如 A 项所述):

(1) 蒸馏水(对照);

(2) GA 10^{-1}M;

(3) GA 10^{-2}M;

(4) GA 10^{-3}M;

(5) GA 10^{-4}M.

用眼药水滴瓶点一滴水或者相应的 GA 溶液于每个已作标记的盆中二株植物的生长点上（每一盆中标上对照或处理植株）. 每次用完后以蒸馏水充分洗涤滴瓶,或者分别使用滴瓶. 也必须用含有和 GA 溶液中一样量的酒精的蒸馏水作对照.

第一次处理后,植株仍放在温室的架子上,并记录在3—4周里出现的一切变化. 每周至少测 3 次株高(从地面起), 节间长度和叶长及叶宽. 每周在最后一次测量后, 以不同的试验溶液重复处理.

观察和测量:

结果和结论

实验每部分作一表, 用以表明测量对照植株和处理植株的平均值. 说明赤霉酸处理的植株主要的生长反应. GA 能从处理植株的使用部分转移至其他部分吗? 除了促进细胞的伸长以外,赤霉素还影响植物的其他什么反应?

此外，讨论一下植物中 GA 合成的可能部位及赤霉素的化学结构.

植物的矮生性是由于遗传所控制的，还是由于缺少赤霉素或者存在特殊的抑制所引起的？还是由于以某种形式抑制了细胞对赤霉素的敏感性呢？试解释.

参 考 文 献

Brian, P.W., G. W. Elson, H G. Hemming, and M. Radley. 1954. The plant growth promoting properties of gibberellic acid, a metabolic product of the fungus *Gibberella fujikuroi*. *J. Sci. Food Agr.* 5:602-612.

Brian, P. W. and H. G. Hemming. 1955. The effect of gibberellic acid on shoot growth of pea seedlings. *Physiol. Plantarum* 8:669-681.

Bukovac, M. J. and S. H. Wittwer. 1957. Gibberellin and higher plants. II. Induction of flowering in biennials. Quar. Bull. Mich. Agric. Exp. Sta. 39(4):650-660.

Chin, R. Y. and J. A. Lockhart. 1965. Translocation of applied gibberellin in bean seedlings. *Amer. J. Bot.* 52:828-833.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp, New York. pp. 458-468,493-495, 534-536.

Graebe, J. E., D. T. Dennis, C. D. Upper, and C. A. West. 1965. Biosynthesis of gibberellins. *J. Biol. Chem.* 240:1847-1854.

Kato, J., W. K Purves, and B. O. Phinney. 1962. Gibberellin-like substances in plants. *Nature* 196:687-688.

Laetsch, W. M. and R. E. Cleland. 1967. Papers on Plant Growth and Development. Little, Brown and Co., Boston.

MvVey, G. R. and S. H. Wittwer. 1958. Gibberellin and higher plants. XI. Responses of certain woody ornamental plants. *Quar. Bull. Mich. Agric. Exp. Sta.* 40(3):679-697.

Paleg, L. G. 1965. Physiological effects of gibberellins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 16:291-322.

Phinney, B. O. 1956. Growth response of single-gene dwarf mutants in maize to gibberellic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 42: 185-189.

Phinney, B. O. and C. A. West. 1960. Gibberellins as native plant growth regulators. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 11:411-436.

Steward, F. C. 1968. Growth and Organization in Plants. Addison-Wesley Publ. Co., Reading, Massachusetts.

实验 49　赤霉酸对产生还原糖的影响
（生物鉴定的基本方法）

目的

通过测定还原糖间接地研究赤霉酸对大麦胚乳中淀粉酶活性的影响.

材料

60 粒大麦 (*Hordeum vulgare* L. 'Naked Blanco Mariout') 在水中浸泡过夜（见步骤 A 项）;

100 毫升次氯酸盐溶液(1%)或者 Chlorox 溶液(1%容量/容量);

赤霉酸母液(10 毫克/100 毫升水);

5 种不同浓度的赤霉酸试验溶液(见步骤 B 项);

Somogyi 试剂(见书后附录);

Nelson 砷钼酸盐试剂(见书后附录);

12 毫克链霉素硫酸盐(固体);

1 克 Rexyn 101 (H^+型)树脂;

分光光度计(波长 540 毫微米或装有 54 号滤光片的Klett 比色计);

7 个比色管(或比色杯);

13 个试管;

5 个容量瓶(100 毫升);

吸量管;

水浴锅(煮沸)。

步骤

A. 制备大麦种子

大约60粒大麦种子(*Hordeum vulgare* L. 'Naked Blanco Mariout')在50%(容量/容量)硫酸中浸泡1小时，倒去酸并以30°C流水冲洗种子过夜。

B. 赤霉酸溶液

从赤霉酸母液(10毫克/100毫升水)按下法连续稀释制备各种试验溶液(编号从1到5号)：

1. 10^{-6}克GA/毫升H_2O(1毫升母液用水稀释到100毫升)；

2. 10^{-7}克GA/毫升H_2O(10毫升溶液1用水稀释到100毫升)；

3. 10^{-8}克GA/毫升H_2O(10毫升溶液2用水稀释至100毫升)；

4. 10^{-9}克GA/毫升H_2O(10毫升溶液3用水稀释至100毫升)；

5. 10^{-10}克GA/毫升H_2O(10毫升溶液4用水稀释至100毫升)。

各吸取试验溶液10毫升于每一三角瓶中，每10毫升的溶液中溶解2.0毫克的链霉素硫酸盐，然后各吸取1毫升于每一试管中，标号从1到5．吸取1毫升水于另一管中(6号管)(每10毫升中也含有2毫克的链霉素硫酸盐)。

C. 赤霉酸处理种子

选择 50 粒大小一致的泡过水的大麦种子，以次氯酸盐溶液（1%）短时间浸泡．用蒸馏水充分洗涤种子以除去残余的次氯酸盐．将其分成 6 组，每粒横切二半，弃去带胚的一半，留下带胚乳的一半．

从每组中选择 4 粒大小一致的半粒种子，并将其放入相应标记的装有 1 毫升 10^{-6}，10^{-7}，10^{-8}，10^{-9}，10^{-10} 克 GA/毫升溶液及水对照（6 号管）的试管中（4 个半粒种子/试管），塞住试管，放在摇床上在室温培养 24 小时．但如果没有摇床的话，也并非是绝对必需的．

在 24 小时末尾，于每一试管中加入 4 毫升蒸馏水，放入冰箱中贮藏到下一个实验课．在下一次实验时，融化试管，每一管中加入约 150 毫克固体的 Rexyn 101（H^+ 型）树脂，紧紧塞住试管，充分振荡溶液，让树脂沉淀，每种溶液取 2 毫升测定还原糖．

D. 还原糖的鉴定

在 6 支装有 2 毫升 Somogyi 试剂的试管中加入 2 毫升种子培养液；同样准备一个试管，装 2 毫升还原糖和 2 毫升蒸馏水（作为试验空白）．

用玻璃球盖住试管，放入沸水浴锅中，使反应液精确地加热 10 分钟，在冷水浴锅中冷却 5 分钟．然后加入 2 毫升 Nelson 砷钼酸盐试剂，混和后，每管的液体转入比色杯或比色管中，用装有 54 号滤光片的比色计或用波长为 540 毫微米的分光光度计测量吸收．保留装有种子的培养混和物，因为可能需要重复颜色反应．

将每种溶液的吸收值记在下面：

结果和结论

作图表示实验结果，每个样品所得的光密度数值或 Klett 单位为纵坐标，赤霉酸的浓度为横坐标绘图. 每种溶液中还原糖的绝对量如何定量地测定？

这里所述的技术作为鉴定不同植物提取液中的赤霉素的方法合适吗？

从你的读数及所得的结果提出赤霉酸对大麦胚乳组织作用的某些概念. 同样考虑一下胚乳组织中的赤霉素、淀粉酶和还原糖的存在对于在正常情况下大麦种子的萌发是否是必需的.

参 考 文 献

Akazawa, T. 1965. Starch, inulin, and other reserve polysaccharides. In: J. Bonner and J. E. Varner (Eds.) Plant Biochemistry. Academic Press, New York and London. pp. 274-275.

Chrispeels, M. J. and J. E. Varner. 1966. Inhibition of gibberellic acid induced formation of α-amylase by abscission. II. *Nature* 212: 1066-1067.

Chrispeels, M. J. and J. E. Varner. 1967. Hormonal control of enzyme synthesis: on the mode of action of gibberellic acid and abscission in aleurone layers of barley. *Plant Physiol.* 42:1008-1016.

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., Princeton, New Jersey. pp. 458-468, 534-536.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153:375-380.

Nicholls, P. B. and L. G. Paleg. 1963. A barley endosperm bioassay for gibberellins. *Nature* 199:823-24.

Paleg, L. G. 1960. Physiological effects of gibberellic acid. I. On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. *Plant Physiol.* 35:293-299.

Paleg, L. G. 1961. Physiological effects of gibberellic acid. III. Observations on its mode of action on barley endosperm. *Plant Physiol.* **36**:829-837.

Paleg, L. G. 1965. Physiological effects of gibberellins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **16**:291-322.

Paleg, L. G., D. Aspinall, B. Coombe, and P. Nicholls. 1964. Physiological effects of gibberellic acid. VI. Other gibberellins in three test systems. *Plant Physiol.* **39**:286-290.

Paleg, L. G., H. Kende, H. Ninnemann, and A. Lang. 1965. Physiological effects of gibberellic acid. VIII. Growth retardants on barley endosperm. *Plant Physiol.* **40**:165-168.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**:19-23.

Varner, J. E. 1964. Gibberellic acid controlled synthesis of α-amylase in barley endosperm. *Plant physiol.* **39**:413-415.

Varner, J. E. 1965. Seed development and germination. In: J. Bonner and J. E. Varner (Eds.) Plant Biochemistry. Academic Press, New York and London. pp. 784-786.

Varner, J. E. and G. Ram Chandra. 1964. Hormonal control of enzyme synthesis in barley endosperm. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**: 100-106.

Varner, J. E., G. Ram Chandra, and M. J. Chrispeels. 1965. Gibberellic acid-controlled synthesis of α-amylase in barley endosperm. *J. Cellular Comp. Physiol.* **66** (suppl. 1):55-68.

Yomo, H. 1960. Studies on the α-amylase activating substances. IV. On the amylase activating action of gibberellin. *Hakko Kyokaishi* **18**:600-602.

实验 50　赤霉酸和蒲公英叶圆片中叶绿素的保持(生物鉴定的基本方法)

目的

研究赤霉酸对蒲公英叶圆片中叶绿素的保持作用，作为赤霉素快速生物测定的基础. 还以激动素和吲哚乙酸来证明这鉴定方法的特效性.

材料

蒲公英(*Taraxacum officinale*)(盆栽或在室外生长的植株)；

3 种赤霉素溶液(0.05,0.5 和 5.0 毫克/升)；

3 种激动素溶液(0.05,0.5 和 5.0 毫克/升)；

3 种吲哚乙酸溶液(0.05,0.5 和 5.0 毫克/升)；

100 毫升丙酮(80%,容量/容量)；

垫着湿滤纸的容器；

10 个培养皿,每个垫一张 Whatman No. 1 滤纸；

吸水纸；

打孔器(内径约 1 厘米)；

聚乙烯容器或塑料袋；

研钵和研杵；

垫有滤纸的瓷漏斗；

侧臂吸滤瓶；

比色杯；

分光光度计.

步骤

A. 植物材料

可用生长在温室里的自然光照下或从室外采集的蒲公英(*Taraxacum officinale*).

B. 制作叶圆片

从蒲公英植株上摘取成熟的并完全展开的叶片，将其放在几层湿吸水纸上. 如果取用幼小叶片，在用作圆片的材料前，将其叶柄插入水中培养1—3天（直至叶色呈均匀的淡绿色为止）. 用打孔器从叶片的脉间部分打下直径合适(大约1厘米)的圆片110个. 每打下一圆片尽快将其放入垫着湿滤纸的容器中.

C. 赤霉酸、激动素和吲哚乙酸对蒲公英叶子圆片中叶绿素保持的作用

准备10个已经标记的垫有Whatman No. 1滤纸的培养皿(每一处理3个培养皿，蒸馏水的一个培养皿)，用表50-1所述的相应试验溶液浸湿各培养皿中的滤纸垫（7厘米直径的滤纸用大约1.0毫升的试验溶液）. 如果滤纸上溶液太多则叶圆片浸水并变黑.

随意挑10个叶圆片转入各培养皿中，盖好培养皿，并用湿吸水纸把培养皿包住.

将培养皿放在聚乙烯容器或塑料袋中，保持高湿度并放在暗中室温下4天. 依照实验15所述提取方法和分光光度法测定总的叶绿素含量. 因为这些样品及实验圆片测定的叶

绿素含量是在相对的基础上进行比较的。因此不必计算叶绿素的绝对量。80%丙酮提取液在波长652毫微米的光密度，读数对测定叶绿素含量的差异是足够的。

4天以后测量每一处理所有叶圆片的叶绿素含量。将每个处理在波长652毫微米上光密度读数，记录表50-1中。

表 50-1 三种生长物质对蒲公英圆片中叶绿素的保持作用

样品	处理(毫克/升)	圆片提取液的吸收(波长652毫微米)		
		GA	K	IAA
0 天*	—			
4 天**	0			
	0.05			
	0.5			
	5.0			

* 在实验开始用一等份圆片的提取液测定总叶绿素量。

** 用一个培养皿作为水对照，在所指的每一栏下填入相同的读数。

结果和结论

用叶绿素提取液光密度读数对着不同的处理作一条线。

根据赤霉酸对蒲公英叶圆片中叶绿素保持的作用来解释结果。在结论中说明赤霉素作用所引起的一些其他普通的生物反应，这个鉴定方法对赤霉素是特效的吗？

参考文献

Fletcher, R. A. and D. J. Osborne. 1965. Regulation of protein and nucleic acid synthesis by gibberellin during leaf senescence. *Nature* **207**: 1176-1177.

Fletcher, R. A. and D. J. Osborne. 1966. Gibberellin, as a regulator of protein and ribonucleic acid synthesis during senescence in leaf cells of *Taraxacum officinale*. *Can. J. Bot.* **44**: 739—745.

Osborne, D. J. and D. R. McCalla. 1961. Rapid bioassay for kinetin and kinins using senescing leaf tissue. *Plant Physiol.* **36**: 219—221.

Paleg, L. G. 1965. Physiological effects of gibberellins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **16**: 291—332.

实验 51 组织培养技术

目的

建立由不同的植物部分诱导愈伤组织培养的基本技术。特别是能够生长出大量愈伤组织的大豆(*Glycine max*)子叶的愈伤组织，用于下面的实验中激动素的生物鉴定。

材料

20 个大豆种子(*Glycine max* L. 'Acme'，其他栽培种也可以使用——见书后附录)，菜豆幼苗(*Phaseolus vulgaris* L.)、向日葵(*Helianthus annuus* L.)或菸草(*Nicotiana tabacum* L.)如果愿意的话，均可用于本实验中描述的技术；

母液(见表 51-1)；

60 克蔗糖；

20 克琼脂(粉末状或片状)；

200 毫升 Chlorox 溶液(10%容量/容量)；

乙醇(95%)；

棉花(未脱脂的)；

锥形烧瓶(两个 2 升，四个 500 毫升，二十个 125 毫升)；

2 个容量瓶(1 升)；

10 个移液管(5 或 10 毫升，具有刻度)；

8 个烧杯 (400 毫升，每个盛装 150 毫升无菌蒸馏水并用铝箔盖上)；

5—10 个无菌培养皿，用纸袋包好(见步骤)；

pH 计；

消毒蒸锅；

接种箱或接种室(不是绝对必要)；

本生灯；

天平(分析用)；

镊子(250 毫米长)；

外科小刀.

步骤

在进行实验步骤 A 项之前，阅读实验步骤 C 项，并决定在培养基中形成愈伤组织采用什么方法来获得无菌组织. 如果用 C 项中第一个方法，首先就要完成 A 项. 如果采用 C 项的第二个方法，就可以省略 A 项而进行 B 项.

A. 在无菌条件下幼苗生长的基本培养基

将大约 500 毫升的蒸馏水加入一个两升的锥形烧瓶中. 然后按表 51-1 中所列 1—8 号母液各加 5 毫升，不要加 11 或 12 号溶液.

在此溶液中溶解 30 克蔗糖并加入蒸馏水使容积达到约 950 毫升. 用氢氧化钠将溶液的 pH 调节至 5.8，然后加水使最后体积到 1 升.

在上述溶液中加入 10 克琼脂，然后用高压消毒蒸锅蒸煮 3—5 分钟或者加热至琼脂融化. 琼脂必须完全融化并混合均匀.

在 4 个 500 毫升的锥形烧瓶中分别注入融化的琼脂培养基各 250 毫升. 用不脱脂的棉塞塞住瓶口，放入高压消毒蒸锅，在 121°C 和 15 磅/平方吋压力下消毒 15 分钟. 还可以同时消毒 4 个 400 毫升盖着铝箔的烧杯，烧杯内装有约 150 毫

表 51-1　愈伤组织培养的母液*

母液编号	组　　分	数　量（克）	最后溶液体积（毫升）
1	KH_2PO_4	30.000	500
2	KNO_3	100.000	
	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	50.000	500
3	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7.150	
	KCl	6.500	500
4	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.492	
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.380	500
5	H_3BO_3	0.160	
	KI	0.080	500
6	NH_4NO_3	100.000	500
7	EDTA $Na_2 \cdot 2H_2O$	1.340	
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.990	500
8	$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$	0.035	500
9	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.010	500
10	维生素 B_1 盐酸盐	0.080	
	菸酸	0.200	
	维生素 B_6 盐酸盐	0.080	
	肌-肌醇	10.000	500
11	α-萘乙酸	0.040	100
12	激动素	0.020	1000

* 本母液是研究工作者为进行许多实验时所制备的．教学使用时，各种组分的数量以及最后溶液的体积都应该适当地减少．

升的蒸馏水(用于 C 项)．

灭菌之后，将培养基置于室温下凝固．培养基凝固之后可以立刻就用，也可以在冰箱贮藏几天之后再用．

B. 愈伤组织生长的培养基

按照 A 节，制备一升培养基，但这次加入母液是 1—11 号各 5 毫升，12 号(激动素) 25 毫升．溶解 30 克蔗糖，加蒸馏

水将溶液容积调至约950毫升，调节pH至5.8，然后加水使最后体积为一升．加入琼脂(10克/升)，融化后将此培养基分别注入20个125毫升的锥形烧瓶中各50毫升．再用纸袋包装5个培养皿，如果省略A项，还要在4个400毫升的烧杯中各装入150毫升的蒸馏水，盖上铝箔．将以上玻璃器皿，包括培养基、培养皿和烧杯置于高压消毒蒸锅中，在121℃、15磅/平方吋压力下消毒15分钟．

C. 培养用的无菌组织的制备

可以选用下面任一方法以获得培养用的组织：

1. 灭菌20粒种子（最好是用大豆 *Glycine max* L. ‘Acme’）．可用列于附录中的任何一种实验材料．用10% Chlorox 溶液浸泡5—10分钟．

用消毒过的镊子(在下面的所有操作中都要使用标准的灭菌技术，即把镊子浸于95%乙醇中消毒，使用之前在火上烤干）将种子移至装有无菌蒸馏水的烧杯中以除去残余的Chlorox．根据A和B项中的指导来制备4烧杯无菌水．

将全部种子移至水中之后，用无菌的铝箔盖上烧杯，种子在烧杯中浸泡3分钟．然后将种子转移到第二个烧杯中，象这样连续处理一共用净水冲洗4次．

用合适的技术(图51-1)将净水冲洗后的5粒种子分别移至装有培养基的500毫升的各锥形烧瓶中(根据上面A项所制备的)．置于室温和恒定荧光灯光照条件下．子叶长好之后(大约二星期)，切下子叶并无菌转移（用摄子）至灭菌过的培养皿中(如D项所指出的)．

2. 可以在温室中用蛭石或砂来培养大豆、菜豆或向日葵的幼苗．如果是这样，组织必须在10% Chlorox 中表面灭菌3—10分钟，然后用无菌蒸馏水冲洗4次(B项中预先准备

的）．所有的处理必需按照标准的无菌技术操作．转移时必需用镊子，镊子要浸于乙醇中，每次使用前在火上烧一下（图51-1）．在最后一次净水中冲洗之后继续进行D项．



图 51-1 组织培养技术的器皿

D. 组织切断和培养

如果采用了严密的灭菌技术，就不一定需要接种箱或接种室．必须记住在切段和转移组织之前所有的用具都要灭菌．

选适宜的组织（来自C项）转移到一个无菌培养皿中，迅速将组织切成方块（约为4×4×2毫米），在有愈伤组织培养基的125毫升瓶中各放进一块，每次移植之后塞上瓶塞．移植完成之后，将培养瓶放入培养室（室温25—27°C，恒定光照，光强度约为40呎烛光）．如果没有培养室，可以将组织放在实验室内恒定的荧光灯光照下．移植后三个星期对培养的组

织进行观察，并把其中被污染的除去。

生长三个星期之后，用无菌操作将愈伤组织切成大约10毫克的方块并转移至新鲜的培养基上进行继代培养(3块/瓶)。同时制作愈伤组织块的徒手切片，将切片置于戴物片上进行组织的显微观察。观察愈伤组织块(clumps)的物理状态，并用显微镜研究其细胞的性质。

观察：

从大豆子叶形成的愈伤组织，每隔三星期进行一次继代培养，直至组织的量足够用于下面的实验。

结果和结论

记录对于愈伤组织块和细胞的观察。愈伤组织体积的增加是由于细胞分裂的结果，还是仅由于细胞延长的结果，或者是由于这两种现象共同的结果？愈伤组织有象正常植物部分的任何分化的组织吗？在所谓的正常的愈伤组织和植物的肿瘤组织之间有什么主要的生理区别(例如冠瘿组织)？

结论中应概括地指出无机盐类、蔗糖、维生素、生长素和激动素在培养中对维持愈伤组织生长的作用。

参考文献

Miller, C. O. 1960. An essay for kinetin-like materials. *Plant Physiol.* **35**, suppl. XXVI.

Miller, C. O. 1961. A kinetin-like compound in maize. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 47: 170—174.

Miller, C. O. 1962. Interaction of 6-Methylaminopurine and adenine in division of soybean cells. *Nature* **194**: 787-788.

Miller, C. O. 1963. Kinetin and kinetin-like compounds. In: H.

F. Linskens and M. V. Tracy (Eds.) Modern Methods of Plant Analysis. Springer- Verlag, Berlin. Vol. 6. pp. 194-202.

White, P. R. 1954. The Cultivation of Animal and Plant Cells. The Ronald Press Co., New York.

White, P. R. and A. R. Grove. (Eds.) 1965. Proc. Intern. Conference on Plant Tissue Culture. McCutchan Publ. Corp., Berkeley, California.

实验 52　激动素对组织培养的大豆愈伤组织生长的作用（生物鉴定的基本方法）

目的

研究不同浓度的激动素对于由大豆(*Glycine max*)子叶所诱导的愈伤组织生长的作用.

材料

大豆愈伤组织(*Glycine max* L. 'Acme'，附录中所列任何一种大豆的实验材料都可以用)；

母液(见表 52-1)；

乙醇(95%)；

30 克蔗糖；

10 克琼脂(粉末状或片状)；

棉花(未脱脂的)；

锥形烧瓶(1 个 1 升，5 个 500 毫升，20 个 125 毫升)；

容量瓶(1 个 500 毫升，5 个 200 毫升，1 个 100 毫升)；

刻度量筒(100 毫升)；

2 支移液管(5 毫升，具刻度)；

5 个培养皿(纸袋包装，灭菌的)；

pH 计；

高压消毒蒸锅；

接种箱或接种室(非绝对必需)；

本生灯；

天平(分析用);
镊子(250毫米长);
外科小刀.

步骤

A. 基本培养基

在1升的锥形烧瓶中加入约200毫升的蒸馏水. 然后,加入表52-1中所列的1—11号母液各5毫升. 此刻不要加入激动素. 充分混合后加入30克蔗糖. 加蒸馏水将溶液体积调至约490毫升,并用NaOH将pH调节至5.8,再加蒸馏水使其最后体积为500毫升. 此溶液就是双倍浓度的基本培养基.

B. 不同浓度激动素的试验培养基

标记5个锥形烧瓶(500毫升),分别取100毫升双倍浓度的基本培养基注入每个瓶中. 按照表52-2加入适量的激动素母液(溶液12). 必要时,检查并调节每个试验液的pH至5.8. 然后,用蒸馏水将每瓶最后体积调至200毫升.

每瓶加入2克琼脂, 然后在高压消毒蒸锅中煮沸5—10分钟,或者适当的加热至琼脂融化. 琼脂必须确实完全融化并混匀.

从500毫升锥形烧瓶中每次取出50毫升融化了的琼脂培养基分别加入到做好标记的125毫升的锥形烧瓶中, 每组处理有4个锥形烧瓶.

用不脱脂的棉花塞上瓶口,在121°C, 15磅/平方吋压力的高压消毒蒸锅中消毒15分钟. 灭菌后, 置于室温至培养基凝固. 用纸袋包好5个培养皿同时消毒.

表 52-1　大豆愈伤组织培养的母液*

母液编号	组　　分	数　量（克）	最后溶液体积（毫升）
1	KH_2PO_4	30.000	500
2	KNO_3	100.000	
	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	50.000	500
3	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7.150	
	KCl	6.500	500
4	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.492	
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.380	500
5	H_3BO_3	0.160	
	KI	0.080	500
6	NH_4NO_3	100.000	500
7	EDTA $Na_2 \cdot 2H_2O$	1.340	
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.990	500
8	$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$	0.035	500
9	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.010	500
10	维生素 $B_1 \cdot HCl$	0.080	
	菸酸	0.200	
	维生素 $B_6 \cdot HCl$	0.080	
	肌-肌醇	10.000	500
11	α-NAA	0.040	100
12	激动素	0.020	1000

*　本母液是研究工作者为做许多实验准备的．教学使用时，各种组分的数量以及最后溶液的体积都应该适当地减少．

C. 愈伤组织的移植

如果没有合适的接种箱或接种室时，在遵守标准无菌操作尽量避免污染率的情况下，愈伤组织的移植过程也可以就在实验室中进行．所需要的器皿和移植程 序如图(图 52-1)．夹住和切断组织时使用的镊子和刀子浸泡于 95% 的乙醇中，使用之前在火上烧一下．用无菌镊子取出一大块（约 300 毫克）大豆愈伤组织的母株放入一无菌培养皿中，立刻盖上盖

表 52-2 各种激动素浓度的大豆生长培养基

瓶号	双倍浓度基本培养基（毫升）	蒸馏水（毫升）	激动素母液（毫升）	最后体积（毫升）	最后激动素的浓度（毫克/升）
1	100	100	0	200	0
2	100	99.5	0.5	200	0.05
3	100	95	5.0	200	0.50
4	100	50	50.0	200	5.00
5	100	0	100.0	200	10.00

子．移开盖子，用无菌小刀将组织切成约 5 毫克/块大小近似的小块．所切的组织块要足够每瓶 3 块．另取 20 块组 织 块作原始鲜重的测定，20 块组织的平均鲜重即可作为每块移植的组织的原始鲜重．



图 52-1 大豆愈伤组织的切段设备

组织移植之后，可放在实验台上培养，因为愈伤组织可以在室温和弱光条件下正常生长。也可以把它们放在27°C，40呎烛恒定日光灯光照的培养箱里生长4星期。

D. 愈伤组织的鲜重测定和观察

组织生长经4个星期之后，测定激动素处理的组织；增加的生长是由于细胞分裂还是扩大而引起，还是两者都有。并测定个体组织块的鲜重。

组织鲜重的测定，小心地将组织块由琼脂上取下，然后用分析天平称重。

观察和鲜重的测定：

E. 实验结果的统计处理

在这一类型的实验中，即在个体处理组与对照组之间的平均差异是由于外源激动素活性与所用生物材料之间在变异相比较而得，对于检验机率水平是有好处的。所以，做一个简单的“t-检验”，首先要将所有参数值填入表52-3中。

1. 对同数的t-检验(用没有因污染而减少的组织)：

计算每一处理结果参数之后，实验中任何两个平均值都可以根据下面任何一个合适的所做成的t-检验来做统计分析。

同数的t-检验方程：

$$t=\frac{\bar{X}_1-\bar{X}_2}{\sqrt{(S_{\bar{X}})^2+(S_{\bar{X}})^2}}=\frac{\bar{D}}{\sqrt{(S_{\bar{X}})^2+(S_{\bar{X}})^2}}$$

平均数之间相比较的差数(D)是从较大的平均重量(X_1)减去

表 52-3 统计学检验

参数	符号	检验	激动素的浓度(毫克/升)				
			0	0.05	0.5	5.0	10.0
个体的数目/处理	N	*	12	12	12	12	12
自由度	f	$f=N-1$	11	11	11	11	11
个体重量总和	$\sum x$	$\sum x=x+x+x+\cdots$，等					
总重平方	$(\sum x)^2$	$(\sum x)^2=(\sum x)(\sum x)$					
个体重量平方总和	$\sum(x^2)$	$\sum(x^2)=x^2+x^2+x^2\cdots$；等					
平均重量/处理	x	$x=\frac{\sum x}{N}$					
校正因数	$C.F.$	$C.F.=\frac{(\sum x)^2}{N}$					
均方个体偏差总和	$\sum X^2$	$\sum X^2=\sum(x^2)-C.F.$					
方差	S^2	$S^2=\frac{\sum X^2}{N-1}$					
标准偏差	S	$S=\sqrt{S^2}$					
平均标准误差	$S_{\overline{X}}$	$S_{\overline{X}}=\sqrt{\frac{\sum X}{N(N-1)}}$					

* N 等于12，除非有的组织因污染而损失.

较小的平均重量 (X_2) 得到的. 此差数除以相比较的处理的平均标准误差的平方总和的平方根.

完成 t-值必需的计算，然后，对合适自由度 (f) 可从任何标准 t-分布表中所列出的相关值中找出显著性水准. 本实验的总自由度 ($N-1$) 等于 12－1 加 12－1 或 22. 如果相比较的任何两个平均数的 t-值是在 0.05 (5%) 的机率范围内，两个平均数之间的差数可称为显著，而在至少 95% 的情况下，其生长反应是由于处理而不是由于样品内在的差异. 同样的，如果所得 t-值是在 0.01 (1%水准)的机率范围内，其差异可称为高度显著.

2. 不同数的 t-检验(如果组织因污染而减少):

在生长期中，同一处理的一些组织可能由于污染而减少. 所以,在此情况发生时,对照(无激动素)的平均数是 $N=12$为基础,而激动素处理之一的平均数则是 $N=10$ 为基础. 建议用下式计算两处理间的平均标准误差:

$$S=\sqrt{\frac{\sum x^2+\sum x^2}{N+N-2}}$$

两个处理的均方($\sum x^2$) 得到的偏差总和的总和除以相比较的两个处理中个体数目(N) 的总和减 2. 找出平方根并用此值(S)计算每个处理的平均标准误差,如下例所指出的:

处理 1 (无激动素)

$$\frac{S}{\sqrt{N_1}}=S_{\overline{X}}$$

处理 2 (加激动素 0.05 毫克/升)

$$\frac{S}{\sqrt{N_2}}=S_{\overline{X}}$$

根据前面所描述的公式，用这两个校正的标准误差来计算 t-值:

$$t=\frac{\bar{X}_1-\bar{X}_2}{\sqrt{(S_{\bar{X}})^2+(S_{\bar{X}})^2}}$$

用一t-分布表检验两个平均数间的差数是在统计学上显著的5%水准，还是在高度显著的1%水准．要记住应用适当的自由度，例如，如果在一个平均数以10个个体为基础，另一个以12个个体为基础之间来进行比较，自由度应等于10－1加12－1，或20．

结果和结论

设计一个表，将结果引入表中以表示在不同浓度的激动素处理和对照之间的显著性水准．同时以激动素的不同浓度平均鲜重(毫克)绘一图解．

讨论不同的激动素浓度对于培养中大豆愈伤组织生长的影响．

参考文献

Blaydes, D. F. 1966. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. *Physiol. Plantarum* 19: 748-753.

Fox, J. E. 1966. Incorporation of a kinin, N, 6-benzyladenine, into soluble RNA. *Plant Physiol.* **41**: 75-82.

Letham, D. S. 1967. Chemistry and physiology of kinetin-like compounds. Ann. Rev. *Plant Physiol.* **18**: 349-364.

Lewis, A. E. 1966. Biostatistics. Reinhold Publ. Corp., New York.

Miller, C. O. 1960. An essay for kinetin-like materials. *Plant Physiol.* **35**, Suppl. XXVI.

Miller, C. O. 1961. A kinetin-like compound in maize. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **47**: 170-174.

Miller, C. O. 1961. Kinetin and related compounds in plant growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **12**: 395-408.

Miller, C. O. 1963. Kinetin and kinetin-like compounds. In: H. F. Linskens and M. V. Tracey (Eds.) Modern Methods of Plant Analysis. Springer-Verlag, Berlin. Vol. 6. pp. 194-202.

Miura, G. A. and C. O. Miller. 1969. 6-(γ, γ-Dimethylallylaminopurine as a precursor to zeatin. *Plant Physiol.* **44**: 372-376.

Snedecor, G. W. 1961. Statistical Methods. The Iowa State Univ. Press, Iowa.

Witham, F. H. and C. O. Miller. 1965. Biological properties of a kinetin-like substance occurring in *Zea mays*. *Physiol. Plantarum* 18: 1007-1017.

实验 53　激动素和3-吲哚乙酸对菸草愈伤组织的生长和芽形成的作用

目的

建立茎髓愈伤组织的培养，测定激动素和生长素对愈伤组织增殖与芽形成的作用.

材料

A 项和 B 项相同的材料：

大约 2 呎高的菸草植物(*Nicotiana tabacum* L.)；

母液(见表 53-1)；

乙醇(95%)；

棉花(不脱脂的)；

刻度量筒(100 毫升)；

12 支移液管(10 毫升或 5 毫升，具刻度)；

1 支移液管(1 毫升，具刻度)；

5 个培养皿(用纸袋包好并予以消毒)；

pH 计、1N NaOH、1N HCl；

高压消毒蒸锅；

接种箱或接种室；

本生灯；

镊子；

打孔器；

外科小刀；

米尺(厘米)；

培养箱或具有恒定照明(40 呎烛光)的培养台；

天平.

A. 项：

70%乙醇；

30 克蔗糖；

10 克琼脂(粉末状或片状)；

2 升的锥形烧瓶；

20 个锥形烧瓶(125 毫升)；

1 个 1 升的容量瓶.

B. 项：

60 克蔗糖；

7 克琼脂(粉末状或片状)；

1 个 1 升的锥形烧瓶；

7 个锥形烧瓶(500 毫升)；

28 个锥形烧瓶(125 毫升).

步骤

最好建立菸草愈伤组织母株的培养，并为实验步骤 B 项的教学提供适当的数量. A 项只可以在课堂上示范髓组织的分离和培养的方法. 另外在上课之前准备好本实验用的所有培养基.

课前做好准备,使整个实验(A 项和 B 项)能够在一堂实验课中进行,并着重于组织分离和移植的各种有关技术.

A. 菸草茎髓愈伤组织培养的建立

1. 菸草茎髓愈伤组织生长的基本培养基：

将大约 500 毫升的蒸馏水加入一个两升的锥形烧瓶中,

除了 7 (EDTA),11 (IAA) 和 12 (激动素) 之外,吸取各种母液（表 53-1） 5 毫升加入此瓶中. 然后再加入 12.5 毫升母液 7 (EDTA),50 毫升母液 11(IAA) 和 50 毫升母液 12(激动素).

表 53-1 莽草愈伤组织培养的母液*

母液编号	组　　分	数　量（克）	最后溶液的容积（毫升）
1	KH_2PO_4	30.000	500
2	KNO_3	100.000	
	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	50.000	500
3	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7.150	
	KCl	6.500	500
4	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.492	
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.380	500
5	H_3BO_3	0.160	
	KI	0.080	500
6	NH_4NO_3	100.000	500
7	EDTA $Na_2 \cdot 2H_2O$(乙二胺四乙酸)	1.340	
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.990	500
8	$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$	0.035	500
9	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.010	500
10	维生素 $B_1 \cdot HCl$	0.080	
	菸酸	0.200	
	维生素 $B_6 \cdot HCl$	0.080	
	肌-肌醇	10.000	500
11	IAA	0.020	200
12	激动素	0.020	1000

* 本母液是研究工作者为进行许多实验时所制备的，教学使用时，各种组分的数量和最后溶液的容积都应该适当的减少。

将 10 克蔗糖溶于以上溶液中,加入足够的蒸馏水使其体积约为 950 毫升. 用氢氧化钠调节溶液 pH 至 5.8，然后加蒸馏水使其最后容积为 1 升.

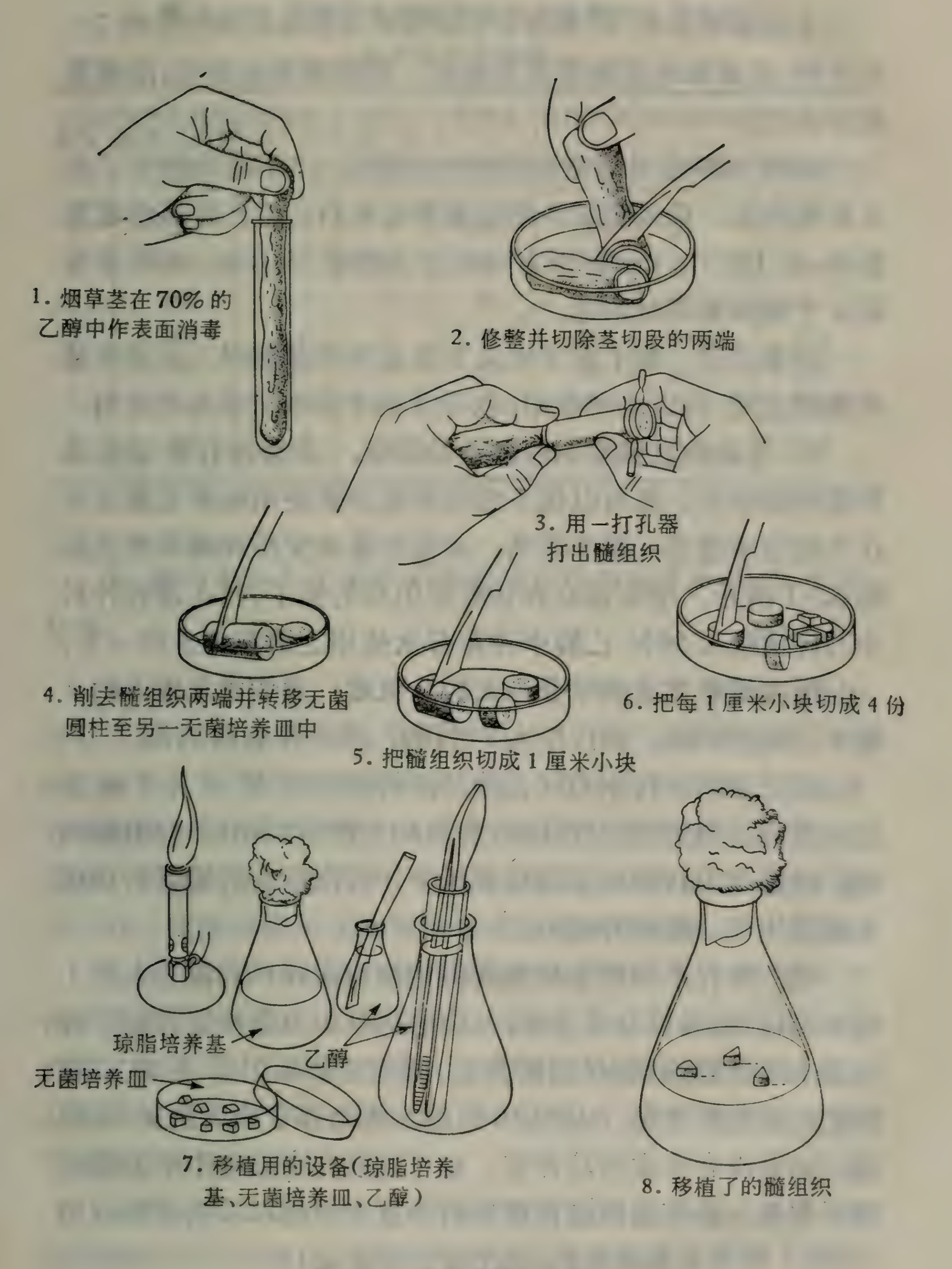


图 53-1　菸草茎髓的分离

上述溶液加入 10 克琼脂，随后放入消毒蒸锅中处理 5—10分钟，或者加热至琼脂完全融化．琼脂需完全融化，溶液要充分混匀．

20 个 125 毫升的锥形烧瓶中分别加入 50 毫升融化了的琼脂培养基．用未脱脂的棉花塞塞住瓶口，置于高压消毒蒸锅中，在 121°C，15 磅/平方吋压力下消毒 15 分钟．用纸袋包装 5 个培养皿同时消毒。

消毒之后，瓶子置于室温下直至培养基凝固．此培养基在凝固之后，可以立即使用，也可以在冰箱中储存几天使用．

2．无菌的茎髓组织的制备和移植：如果没有合适的接种箱和接种室，就可以按下面的实验步骤使用标准无菌技术在实验室中进行，很少污染．必需的器皿安排和操作要点如图 53-1 所示．用来镊取和切断组织用的镊子、打孔器和外科小刀应该浸入 95% 乙醇中并在每次使用之前在火上烧一下．

削去烟草茎上的叶子（大约 2 呎高）并切成几段大约 9 厘米长的茎切段．切段浸入 70%的乙醇中作表面消毒．

用无菌的外科小刀切去茎切段的两端使其成为 7 厘米长．然后，用无菌的打孔器(直径约与髓组织相同)打出髓组织．将髓组织转移至无菌培养皿中，再次切去两端并转移此无菌圆柱至一新培养皿中．

用一外科小刀将每块髓组织切段切成较小的段（大约 1 厘米宽）。每段再分成 4 份，并将这些组织分别移植到每个含有基本培养基的瓶中(3 块/瓶)．被培养的组织放在 27°C 和恒定的荧光灯光照（大约 40 呎烛）的培养室中大约 4—5 星期．如果没有合适的培养室，也可以放在实验室中于恒定光照下生长．愈伤组织进行继代培养直至足够以后的实验应用(大约 1 瓶有 3 大块组织/每个学生或小组)．

表 53-2　不同浓度的激动素和生长素的菸草愈伤组织生长培养基

瓶号	双倍浓度的基本培养基（毫升）	激动素母液（毫升）	IAA 母液（毫升）	蒸馏水（毫升）	最终容积（毫升）	激动素浓度（毫克/升）	IAA 浓度（毫克/升）
1	100	0	0	100	200	0	0
2	100	0	10	90	200	0	5.0
3	100	5.0	0	95	200	0.5	0
4	100	0.5	10	89.5	200	0.05	5.0
5	100	5.0	10	85	200	0.5	5.0
6	100	10.0	10	80	200	1.0	5.0
7	100	50.0	10	40	200	5.0	5.0

B. 激动素和生长素对菸草愈伤组织的生长和芽形成的影响

1. 基本培养基：加入大约 200 毫升的蒸馏水到 1 升的锥形烧瓶中，吸取表 53-1 所列的母液 1—10 号各10 毫升．此时切勿加入3-吲哚乙酸或者激动素．充分混合之后，在此溶液中溶解 60 克蔗糖，并加入足够的蒸馏水使其容积约为 950 毫升．用氢氧化钠调节 pH 至 5.8，然后加水使其最后容积为 1 升．此溶液将被用为双倍浓度的基本培养基．

2. 含有不同激动素浓度试验培养基的制备：标记 7 个锥形烧瓶（500 毫升），每瓶注入 100 毫升双倍浓度的基本培养基．如表 53-2 所标明，加入适量的激动素和生长素母液．必要时校正和调节每个溶液的 pH 至 5.8．然后用蒸馏水调节每瓶的容积至 200 毫升．

每瓶加入 1 克琼脂，用高压消毒蒸锅消毒 5—10 分钟，或适当加热至琼脂融化．琼脂必须完全融化并混匀．

从每个 500 毫升瓶中每次倾出 50 毫升融化了的琼脂培

养基至相同标记的 125 毫升锥形烧瓶中(4 瓶/处理).

用未脱脂的棉花塞塞住锥形烧瓶. 在高压消毒蒸锅中消毒 15 分钟(121°C, 15 磅/平方吋) 用纸袋包装 5 个培养皿同时消毒. 消毒之后,将瓶子置于室温至培养基凝固.

3. 愈伤组织的移植: 要严格按无菌技术操作,每次使用之前, 消毒那些操作中使用的镊子和切削组织用的外科小刀. 用镊子将一大块菸草愈伤组织材料转移至一个无菌培养皿中. 然后把组织切成小块(大约 40 毫克鲜重),将这些组织块移植于含有试验培养基的 125 毫升锥形烧瓶中.

移置之后, 置培养物于恒定光照下的实验台上; 或置于 27°C,恒定日光灯 40 呎烛光光照下持续 5—8 星期.

生长期间观察培养物(切勿打开塞子)并对培养物情况作每周记录.

观察:

在生长期结束之后, 记录在不同试验培养基上的组织生长情况的最后观察结果. 注意组织的颜色、愈伤组织的相对量以及每块组织的平均出芽数目. 测定各处理的组织平均鲜重. 同样,用显微镜观察愈伤组织的生长是由于细胞分裂,还是由于细胞扩大,或者是两者都有. 作一表格,记录最终观察和测量的结果. 在此表中,应列入下列各项: 处理数目、每个处理中愈伤组织生长的相对量、芽形成的平均数目以及组织块的平均鲜重.

结果和结论

解释这些结果(如表中所列的)并根据所得到的结论分别

回答以下问题：

1. 在培养瓶中看到的愈伤组织的增殖，体积增加是否完全由于细胞分裂或细胞延长的结果？

2. 激动素或生长素能单独刺激烟草愈伤组织的生长或分化吗？

3. 本实验是否能够鉴定激动素主要地是刺激细胞分裂？解释之.

4. 列举一些用烟草愈伤组织培养研究生长的化学调节作用的优越性.

5. 烟草愈伤组织培养系统作为自然存在的细胞分裂素或生长素的一种生物鉴定方法是否有用？解释之.

参 考 文 献

Jablonski, J. R. and F. Skoog. 1954. Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue. *Physiol. Plantarum* 7: 16-24.

Linsmaier, E. M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 18: 100-127.

Matsubara, S., D. J. Armstrong, and F. Skoog. 1968. Cytokinin in tRNA of Corynebacterium fascians. *Plant Physiol.* 43: 451-53.

Miller, C. O., F. Skoog, F. S. Okumura, M. H. Von Saltza, and F. M. Strong. 1955. Structure and synthesis of kinetin. *J. Amer. Chem. Soc.* 77: 2662-2663.

Miller, C. O., F. Skoog, F. S. Okumura, M. H. Von Saltza, and F. M. Strong. 1956. Isolation, structure, and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J. Amer. Chem. Soc.* 78: 1375-1380.

Miller, C. O., F. Skoog, M. H. Von Saltza, and F. M. Strong. 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Amer. Chem. Soc.* 77: 1392.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15: 473-497.

Rogozinska, J. H., J. P. Helgeson, and F. Skoog. 1964. Tests for kinetin-like growth promoting activities of triacanthine and its isomer, 6(γ, γ-dimethylallylamino)-purine. *Physiol. Plantarum* 17:165-176.

Skoog, F. and C. O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131.

White, P. R. and A. R. Grove (Eds.) 1965. Proceedings of an International Conference on Plant Tissue Culture. McCutchan Publ. Corp., Berkeley, Calif.

实验 54 激动素对离体小麦叶片叶绿素的保持作用

目的

以离体小麦叶片中叶绿素的保持来证明细胞激动素在延缓衰老中的作用.

材料

60 株 9 天龄的小麦幼苗 (*Triticum aestivum* L. ‘Red Coat’);

丙酮(85%);

8 个烧杯(1000 毫升);

8 个培养皿;

3 种不同浓度的激动素溶液(10.0 毫克/升,5.0毫克/升,和 0.5 毫克/升);

组织捣碎机或研钵和研杵;

比色计或分光光度计.

步骤

A. 植物材料

把小麦种子 (*Triticum aestivum* L. ‘Red Coat’) 播种在平整的土壤上,在温室中培育,直到小麦高约 10 厘米(约 9 天苗龄), 从舌状部分取下 50 个叶片, 放到装有蒸馏水的烧杯

中.

把小麦叶片放在蒸馏水中并在荧光灯下 2—3 天. 这个老化时期就能引起可见的叶绿素分解过程的开始.

假如没有小麦,可以用菸草、向日葵、苍耳或其它薄叶种类的整片叶子或叶圆片. 如果用成熟变老的叶子(淡绿色),可以省略如上述的小麦叶片的预先浸泡. 如果使用叶圆片,垫一张滤纸在培养皿里,用大约 1 毫升试液(参看 B 项)湿润. 如果使用的液体过多,则由于组织充水,而叶圆片逐渐变黑. 在观察期中间,应把有叶圆片的培养皿包在湿纸里,或存放在潮湿的环境里.

B. 激动素对离体叶片中叶绿素保持的作用

准备 8 个培养皿(每种处理两个)装如下液体中的一种25 毫升:

1. 蒸馏水;
2. 激动素溶液(0.5 毫克/升);
3. 激动素溶液(5.0 毫克/升);
4. 激动素溶液(10.0 毫克/升).

从装有蒸馏水的烧杯中随机选 5 个离体叶片转移到每个培养皿中,盖上培养皿把它们放到荧光灯下,接着测定留在烧杯中的叶片叶绿素总含量(毫克叶绿素/克组织)(参看实验 15). 最初的叶绿素总含量作为以后实验的叶子进行比较的参考.

在实验过程中(8—10 天),把培养皿中的离体叶片,每天给以 16 小时的黑暗温度为 4—10°C 和 8 小时的光照温度 20—25°C. 也可用其他方法来抑制微生物的生长,但是每天 16 小时冷处理是适合的,可免除叶表面的消毒及试液和培养皿消毒的需要. 然而,更精密的工作需要比这里所说的更小心些.

每隔一天观察每一离体试验叶片的颜色，从 1—5 定它的等级，与被定为 5 级的正常的整体的叶子的颜色相比较.

8—10 天以后测定每一个处理叶片的叶绿素总含量（毫克叶绿素/克组织）.

观察及总叶绿素值：

结果和结论

画一个表，表明每一个处理的叶子颜色的等级和试验开始后的日数. 用叶绿素总值对着 4 个处理画一个图. 如果愿意，可用一个线条图来表明实验结果.

根据激动素对离体小麦叶片叶绿素保持作用解释结果. 结论中指明由细胞分裂素的作用所引起的其它生物学反应. 根据所得的结果提出细胞分裂素对离体叶片的作用的可能的生物化学解释.

参 考 文 献

Devlin, R. M. 1966. Plant Physiology. Reinhold Publ. Corp., New York. pp. 200, 468-473.

Helgeson, J. P. 1968. The cytokinins. Synthetic and naturally occurring N^6-substituted adenine derivatives profoundly affect plant growth. *Science* **161** (3845): 974-981.

Letham, D. S. 1967. Chemistry and physiology of kinetin-like compounds. Ann. Rev. *Plant Physiol.* **18**: 349-364.

Osborne, D. J. 1962. Effect of kinetin on protein and nucleic acid metabolism in *Xanthium* leaves during senescence. *Plant Physiol.* **37**: 595-602.

Person, C., D. J. Samborski, and F. R. Forsyth. 1957. Effect of benzimidazole on detached wheat leaves. *Nature* **180**: 1294-1295.

Richmond, A. E. and A. Lang. 1957. Effect of kinetin on protein

content and survival of detached *Xanthium* leaves. *Science* **125**: 650-651.

Shantz, E. M. 1966. Chemistry of naturally-occurring growth-regulating substances. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **17**: 409-438.

Sugiura, M., K. Umemura, and Y. Oota. 1962. The effect of kinetin on protein levels of tobacco leaf disks. *Physiol. Plantarum.* **15**: 457-464.

Witham, F. W. and C. O. Miller. 1965. Biological properties of a kinetin-like substance occurring in *Zea mays*. *Physiol. Plantarum.* **18**: 1007-1017.

实验 55 激动素和生长素对次生枝条发育的相互作用

目的

证明天然的或被外加3-吲哚乙酸诱导的侧芽的抑制，可以不同程度地被不同浓度的激动素所解除.

材料

50 个豌豆种子(*Pisum sativum* L. ‘Alaska’)；

100 毫升 Chlorox溶液(10%)；

三种不同浓度的激动素溶液(20 毫克/升，10 毫克/升，1.0 毫克/升)；

吲哚乙酸溶液(20 毫克/升)；

三种母液：

激动素(10 毫克/升)+吲哚乙酸(20 毫克/升)，

激动素(10 毫克/升)+吲哚乙酸(10 毫克/升)，

激动素(10 毫克/升)+吲哚乙酸(1.0 毫克/升)；

灭菌蒸馏水；

3 个深的培养皿或烧杯，装有灭菌蒸馏水用盖盖着；

垫有用 10 毫升灭菌蒸馏水湿润的 3 张 Whatman No. 1 滤纸的灭菌培养皿；

移液管数支(10 毫升)；

8个试管(16 厘米×15 毫米)；

数个试管架；

数把镊子(每次操作前灭菌).

步骤

A. 种子在无菌条件下发芽

将豌豆种子在10%的 Chlorox 溶液中浸泡 5—10 分钟. 用灭菌的镊子，在无菌条件下把种子从 Chlorox 溶液中转移到装有无菌水的烧杯中，5—10 分钟以后把种子转移到装有无菌水的第二个烧杯中，然后到第三个烧杯中. 在这三个烧杯的水中洗了以后，把种子在无菌条件下转移到垫有用大约 10 毫升水湿润的 3张 Whatman No. 1 滤纸的培养皿中. 盖上培养皿让种子在室温和大约 40 呎烛光恒定照明下发芽. 种子在光亮中发芽以延缓发育着的幼苗节间的延长.

B. 处理的准备

吸 10 毫升水或贮备液到 16 厘米×15 毫米的试管中，以便配成在表 55-1 所表明的试液. 每一个试验一个处理准备 5 个试管；除非参加实验的学生相当多，可以把所有的结果合在一起，则可减少每一处理的试管数目.

把试管和装剩余试液的各个瓶用棉花塞上，在 121°C 和每平方吋 15 磅压力下的消毒蒸锅中消毒 15 分钟. 消毒后让试液冷至室温.

C. 幼苗转移到各种试液中

无菌条件下把一株 3 天苗龄的幼苗转移到含有无菌试液的 16 厘米×15 毫米的每个试管中. 用灭菌的镊子(每次操作前用酒精烧一烧)操作，每个试管中溶液的深度应足够浸没幼苗的第一个节(参看图 55-1)，把苗放在与发芽同样的光照

表 55-1 激动素和吲哚乙酸对侧芽生长的影响

试管号数	处理（毫克/升）	总数(a)和平均数(b)					
		侧芽		1°茎基部粗度		2°茎基部粗度	
		a	b	a	b	a	b
1	蒸馏水						
2	激动素(1.0)						
3	激动素(10.0)						
4	激动素(20.0)						
5	吲哚乙酸(20.0)						
6	激动素(10.0)+吲哚乙酸(1.0)						
7	激动素(10.0)+吲哚乙酸(10.0)						
8	激动素(10.0)+吲哚乙酸(20.0)						

和温度条件下 8 天.

在试验过程中约每 48 小时每一试管必须补加无菌水或激素溶液以维持每株幼苗的第一节继续浸没在溶液中。

8 天中每天观察幼苗并记下刚发育的和发育完全的侧芽数和初生、侧生枝的基部粗度. 记下在幼苗形态上任何粗大的畸形现象.

观察:

结果和结论

在 8 天的末尾把每一处理的幼苗的侧枝数(不管长度)记在表 55-1 中,如果在教师指导下,该表可作为全班的结果.

根据每一个处理的平均侧枝数作一线条图，报告的结果中包括对幼苗形态的观察。

从所获得的结果，讨论激动素和生长素在调节次生枝条发育和正常生长中的相互关系。从生长素的影响产生顶端优势的现象，提出激动素刺激侧芽生长的一些理由。



图 55-1 把豌豆苗转移到试管中

参 考 文 献

Miller, C. O. and F. Skoog. 1953. Chemical control of bud formation in tobacco stem segments. *Amer. J. Bot.* 40:768-773.

Sachs, T. and K. V. Thimann. 1964. Release of lateral buds from apical dominance. *Nature* 201:939-940.

Samuels, R. M. 1961. Bacterial induced fasciation in *Pisum sativum* var. *Alaska*. Doctoral Thesis, Indiana University Library.

Skoog, F. and K. V. Thimann. 1934. Further experiments on the inhibition of the development of lateral buds by growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 20:480-485.

Wickson, M. and K. V. Thimann. 1958. The antagonism of

auxin and kinetin in apical dominance. *Physiol. Plantarum* **11**:62-74.

Wickson, M. and K. V. Thimann. 1960. The antagonism of auxin and kinetin in apical dominance. II. The transport of IAA in pea stems in relation to apical dominance. *Physiol. Plantarum* **13**:539-554.

Witham, F. H. and C. O. Miller. 1965. Biological properties of a kinetin-like substance occurring in *Zea mays*. *Physiol. Plantarum* **18**:1007-1017.

实验 56　激动素和赤霉酸对萝卜子叶增大的作用（生物鉴定的基本方法）

目的

研究激动素和赤霉酸对萝卜子叶加大的作用并用其生物效应作为鉴定合成的和天然出现的细胞分裂素的条件.

材料

200 个萝卜苗 (*Raphanus sativus* L. 'Long Scarlet',可用市场上的品系,参看操作步骤 A 项);

500 毫升磷酸钾缓冲液(2 mM,pH 5.9,参看书后附录);

10 毫升激动素母液(5 毫克/1 升水);

10 毫升激动素母液(5毫克/1升磷酸钾缓冲液,pH 5.9);

10 毫升赤霉酸母液(5 毫克/1 升水);

10 毫升赤霉酸母液(5毫克/1升磷酸钾缓冲液,pH 5.9);

18 个培养皿(垫 1 张 Whatman No. 1 滤纸,直径9厘米).

步骤

A. 萝卜种子发芽

把 200 个萝卜子播种在垫有用蒸馏水湿润滤纸的盘子里,把盘子装在塑料袋中,在黑暗中 26°C 保持种子. 大约 30 小时以后, 从每个幼苗上切下较小的子叶. 一定要从离体子

叶上去掉全部下胚轴，选择大小一致的子叶用于下面的步骤.

B. 培养萝卜子叶在激动素和赤霉酸水溶液中

把各垫有一张层析 Whatman No. 1 滤纸（直径 9 厘米）的 9 个培养皿都贴上标签，用表 56-1 所列的各种试液 3 毫升湿润滤纸.

表 56-1 激动素和赤霉酸对萝卜子叶增大的影响（B 和 C 部分）*

培养皿的号数	所用的化合物	B 部分 在水中的浓度（毫克/升）	C 部分 在磷酸盐缓冲液中的浓度（毫克/升）	子叶重（毫克）	
				B	C
1	蒸馏水	—	—		
2	激动素	0.005	0.005		
3	激动素	0.05	0.05		
4	激动素	0.5	0.5		
5	激动素	5.0	5.0		
6	赤霉酸	0.005	0.005		
7	赤霉酸	0.05	0.05		
8	赤霉酸	0.5	0.5		
9	赤霉酸	5.0	5.0		

* 用激动素和赤霉酸母液连续稀释配成上述浓度的激动素和赤霉酸.

在每个培养皿的滤纸上放 10 片子叶，盖上培养皿，把它们放到垫有湿润了的滤纸的盘子上。然后把盘子放到塑料袋中以维持高度湿润. 在 25°C 和恒定的荧光灯下培养 3 天后，将子叶称重到接近毫克.

把每个处理的重量记在下面，并将平均数填于表 56-1 中.

培养后的子叶重：

C. 培养在溶解于 2 mM (毫克分子) 磷酸盐缓冲液 (pH 5.8—6.0) 的激动素和赤霉酸后的子叶重

准确地按 B 项概述的同一操作步骤，但是这次是单独用磷酸钾缓冲液(对照)和把激动素和赤霉酸溶解于缓冲液中(参看表 56-1 的浓度).

在 25°C 恒定的日光灯下培养 3 天以后，把每个处理的子叶重记在下边，并将每个处理的平均重填于表 56-1 中.

培养后的子叶重:

结果和结论

以每一处理的子叶平均重 (以毫克计) 为纵坐标，对着不同浓度的激动素和赤霉酸 (在水中和在 2 mM 磷酸盐缓冲液中)作一个图解.

作为结果说明，应指出激动素溶解在水和在磷酸盐缓冲液中的试验的特点. 在萝卜子叶试验中，在什么情况下应使用比较纯的细胞激动素-水溶液?在什么情况下应使用含有细胞激动素的磷酸盐缓冲提取物?

参 考 文 献

Letham, D. S. 1963. Purification of factors inducing cell division extracted from plum fruitlets. *Life Sciences* 2:152-157.

Letham, D. 1963. Zeatin a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences* 2:569-573.

Letham, D. S. 1968. A new cytokinin bioassay and the naturally-occurring cytokinin complex. In: F. Wightman and G. Setterfield (Eds.) Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances,

The Runge Press Ltd., Ottawa, Canada. pp. 19-31.

Letham, D. S. 1969. Cytokinins and their relation to other phytohormones. *Bioscience* **19** (4):309-316.

Letham, D. S. and C. O. Miller. 1965. Identity of kinetin-like factors from *Zea mays*. *Plant Cell Physiol.* **6**:355-359.

Letham, D. S., J. S. Shannon, and I. R. McDonald. 1964. The structure of zeatin, a factor inducing cell division. *Proc. Chem. Soc.* July. pp. 230-231.

附录　材料与试剂的制备

1. $AlCl_3$ 喷洒试剂　实验 17

溶解 2 克 $AlCl_3$ 并加蒸馏水至 100 毫升.

2. 钼酸铵试剂(现用现配)　实验 2

取 7 克钼酸铵溶于 50 毫升蒸馏水，微热以加速溶解. 溶液过滤后加入 50 毫升浓 HNO_3(比重 1.42)，将此溶液缓慢倒入 100 毫升水中，储于有玻璃塞的滴瓶中. 溶液有腐蚀性，不得与衣物、皮肤接触.

3. 蒽酮试剂(现用现配)　实验 4

加 0.4 克蒽酮 (anthrone) 于 100 毫升浓 H_2SO_4 中，混匀. 勿与衣物、皮肤接触.

4. Barfoed 试剂　实验 5

将 13.3 克结晶醋酸铜溶解于 200 毫升蒸馏水中，过滤后加 1.9 毫升冰醋酸，混合后按指导应用.

5. Benedict 试剂　实验 5,7,31

分别制备 a, b 两种母液：

a. 溶解 173 克柠檬酸钠及 100 克无水碳酸钠于 800 毫升热蒸馏水中，过滤并用蒸馏水稀释至 850 毫升；

b. 溶解 17.3 克纯结晶硫酸铜于 100 毫升蒸馏水中.

应用的试剂：将 b 液缓慢注入 a 液中，稀释至 1 升，混匀.

6. Bial 试剂(现用现配)　实验 5

溶解 5-甲基苯二酚 (orcinol, 5-methyl-resorcinol) 6.0 克于 200 毫升 95% 乙醇中，然后加 40 滴 10% $FeCl_3$ 溶液，混

匀(溶解 10 克 $FeCl_3$ 并加蒸馏水至 100 毫升).

7. Biuret 试剂　实验 13

分别制备 a, b 二液:

a. 浓 KOH(约 20%,重量/容量);

b. 0.5% $CuSO_4$(重量/容量).

应用的试剂: 将未知液与 a 液等体积混合后, 慢慢加入 b液 1 毫升,等待颜色反应.

8. 缓冲液　实验 32

(其他缓冲液根据类型按字母顺序列在每一实验的材料部分)

a. 硼酸钠缓冲液(pH 8.0, 8.8, 9.0)

分别制备二种母液:

(1) 0.2 M H_3BO_3 (12.4 克 H_3BO_3 溶于 1 升蒸馏水中);

(2) 0.2 M $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (76.28 克 $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 溶于 1 升蒸馏水中).

配制不同pH 缓冲液时, 上述二液混合用量如下:

缓冲液号数	硼　酸(0.2 M)(毫升)	硼酸钠(0.2 M)(毫升)	pH
1*	50	30.0	8.8
2	50	4.9	8.0
3	50	59.0	9.0

* 1号缓冲液用于酶制备及其他反应混合物(特殊指明者例外).

b. 硼酸钠缓冲液(pH 10.0)

溶解 12.4 克硼酸于 100 毫升 1 N NaOH(无碳酸盐),再以蒸馏水稀释至 1 升.

取 6 份上述溶液加 4 份 0.1 N NaOH,pH 约为 10.0. 此

缓冲液用于实验 32 F 项.

C. 磷酸盐缓冲液(pH 6.2)

分别制备两种溶液:

(1) $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (11.876 克溶于蒸馏水稀释至 1 升);

(2) KH_2PO_4(9.078 克溶于蒸馏水稀释至 1 升).

取 2 份(1)液加 8 份(2)液, pH 约为 6.2, 必要时校准 pH 值,如实验 32 F 项所述用此缓冲液.

9. 柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH 6.8)　实验 36

分别制备两种溶液:

a. 0.1 M 柠檬酸(含 1 个结晶水): 溶解 21.014 克 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 于蒸馏水中,稀释至 1 升。

b. 0.2 M 磷酸钠(二碱价): 溶解 53.614 克 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 于蒸馏水中,稀释至 1 升.

取 182 毫升 a 液加 618 毫升 b 液,以蒸馏水稀释至 1 升, pH 约 6.8. 用此缓冲液制备重碳酸钠溶液, 用于同一实验(参阅实验 36 材料部分).

10. 铜氨试剂　实验 18

溶解 $Cu(OH)_2$ 于浓 NH_4OH, 制备氢氧化铜饱和溶液. 溶液饱和后无需过滤, 倾倒深蓝液于玻璃瓶中, 玻璃塞塞紧, 贮于冰箱中备用.

11. 二苯胺试剂(现用现配)　实验 2

1 克二苯胺溶于 100 毫升浓 H_2SO_4, 倒入玻璃塞的滴瓶中. 有腐蚀性,勿与衣物、皮肤接触.

12. 二苯胺试剂(现用现配)　实验 9

1 克二苯胺溶于 100 毫升冰醋酸, 再加 2.75 毫升浓 H_2SO_4,倒入玻璃瓶中. 此溶液的腐蚀性极强.

13. 乙醛酸试剂　实验 11

加10克镁粉于烧瓶中，加少量蒸馏水以能没过镁粉为宜，缓慢加入冷的饱和草酸钠液250毫升，同时使烧瓶在流水或冰浴中冷却．过滤，并酸化滤液，用蒸馏水稀释至1升．

14．绿色安全光 实验40，41(参阅本附录**17**)

15．碘(I_2KI)试剂 实验7

溶解2.5克碘及5克KI于50毫升蒸馏水，先溶解一个以后再溶一个，并充分搅拌．应用时取1份母液加9份蒸馏水稀释．

16．碘-碘化钾溶液 实验18，19

15克碘化钾(KI)溶于600毫升蒸馏水，再加3克结晶碘，用蒸馏水稀释至1升．

17．光源及滤光片 实验40，41

a．绿色安全光(透光范围510—550毫微米)：可用15瓦绿色日光灯装配，深绿色玻璃纸过滤．使用前用分光光度计检验其透光光谱(参阅滤光片——透光光谱)．此点很重要，因为各种滤光物有差异．例如，一层绿色玻璃纸往往不能达到要求，而是绿色和蓝色玻璃纸结合着用才能得到满意结果．

合适的滤光片应该放在灯泡的前面，并与灯罩贴紧，使其不露光．另一个办法是用手电筒简单地通过适宜的过滤物而得到合用的绿色安全光．

b．远红光(透光范围700—735毫微米)：可用40或60瓦普通白热台灯经四层蓝色、一层绿色及二层红色玻璃纸过滤即可．但玻璃纸的性质不同，必要时在使用前检查透过光的光谱．

若用探照灯，必须以一杯6厘米深的水将照射的样品隔开．高瓦数的灯泡若长时间照射可能漂白玻璃纸的色素．用低瓦数的灯泡，可将过滤器放在光源前面并紧贴在灯罩上．另一个解决办法是将材料放在没有盖的暗箱中，用过滤物代

替暗箱盖.

c. 红光(透光范围 590—700 毫微米)：在台灯上装一个 40 瓦红色或白色白热灯泡，一个冷的白日光灯或红日光灯亦可. 一般用两层红玻璃纸滤光.

d. 滤光片——透光光谱：

测定滤光系统的透光光谱时将玻璃纸片切成与分光光度计小杯大小相同的长方块或圆片. 把纸片贴附于小杯内壁(靠近光的一面). 为了把透光光谱测得准确，使滤光物在壁上贴平并使一切光首先通过滤光物是绝对需要的. 同样，准备第二个小杯用无色玻璃纸为对照.

测量透光光谱时在 450—750 毫微米范围内，间隔 15 毫微米。测量每一个波长时均调无色玻璃纸的小杯的透光为 100%。如果选用的滤光系统达不到所需透光光谱的要求，则用试验决定滤光材料的组合，一旦得到所需的光谱即可按前法使用.

18. 镁试剂(现用现配)　实验 2

0.1 克 Na_3PO_4 及 30 克 NH_4Cl 溶于 50 毫升蒸馏水。加 2.5 毫升浓 NH_4OH，用蒸馏水稀释至 100 毫升，储于滴瓶中.

19. 甲基红溶液　实验 19

0.5 克甲基红溶于 300 毫升 95%乙醇，用蒸馏水稀释至 500 毫升，充分混匀.

20. Millon 试剂　实验 11

10 毫升液体汞溶于 188 毫升浓 HNO_3 (小心操作)，溶解时用通风橱. 当释放的棕色气体停止时，加两倍体积的蒸馏水。倒出上清液储于有玻璃塞的瓶中。

21. Molish 试剂　实验 5

溶解 10 克 α-萘酚于 100 毫升 95%乙醇，储于有玻璃塞

的瓶中.

22. Nelson's 偶砷钼试剂 实验 49

分别制备两种母液:

a. 25 克$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$溶于 450 毫升蒸馏水,再加 21 毫升浓 H_2SO_4,混匀;

b. 3 克 $Na_2AsO_4 \cdot 7H_2O$ 溶于 25 毫升蒸馏水.

应用溶液:

混合 a、b 二液,储于棕色瓶中,必须至少在用前一天制备好.若产生淡绿色则不宜应用.

23. 水合茚三酮试剂(现用现配) 实验 11

0.1 克水合茚三酮(ninhydrin)溶于 100 毫升水饱和的正丁醇中,储存在玻璃瓶中.

24. 水合茚三酮喷洒剂(现用现配) 实验 12

0.2%水合茚三酮液(溶 0.2 克水合茚三酮triketohydrindene hydrate)于 100 毫升水饱和的正丁醇.

25. 5-甲基苯二酚(Orcinol)试剂(现用现配) 实验 9

0.5 毫升 10% $FeCl_3$ (重量/容量)用浓 HCl 稀释至 100 毫升,再溶解 1 克 5-甲基苯二酚,充分混匀.有腐蚀性,勿与皮肤、衣物接触。

26. 对-甲氧基苯胺(*p*-Anisidine) 试剂 (现用现配) 实验 6

加 2 毫升磷酸于 50 毫升 95% 乙醇中。溶解 0.5 克对-甲氧基苯胺于此混合液,然后加过量浓 HCl 至溶液变为红紫色.

27. 苯肼试剂 (phenylhydrazine) 实验 5

加 2 克盐酸苯肼 (phenylhydrazine hydrochloride)于 30 毫升水中并搅拌.纯化合物可以完全溶解,必要时过滤.加 3 克无水醋酸钠混合之.注意,苯肼有毒!不得接触皮肤.

28. 磷酸盐缓冲液(0.3 M, pH 7.0)　实验 34

依次溶解 4 克 KH_2PO_4 及 5.2 克 K_2HPO_4，用蒸馏水稀释至 100 毫升. 用 HCl 或 NaOH 调 pH 至 7.0.

29. 磷酸-柠檬酸缓冲液 (pH 5.6)　实验 7

分别制备两种母液:

a. 100 毫升 0.1 M 柠檬酸溶液;

b. 100 毫升 0.2 M Na_2HPO_4 溶液.

应用溶液:

42 毫升 a 液加 58 毫升 b 液混匀. 必要时用 HCl 或 NaOH 调 pH 至 5.6.

30. 多孔陶瓷杯　实验 24

31. 磷酸钾缓冲液(2mM, pH 5.8—6.0)　实验 56

制备两种母液:

a. 0.02 M KH_2PO_4: 溶解 0.272 克 KH_2PO_4 并用蒸馏水稀释至 100 毫升;

b. 0.02 M K_2HPO_4: 溶解 0.348 克 K_2HPO_4 并用蒸馏水稀释至 100 毫升.

应用缓冲液:

取 20 毫升 a 液倒入烧杯, 慢慢加少量 b 液调到所需的 pH 值(5.8—6.0之间). 每次加入 b 液时一定要混匀并校正 pH 值.

调节 pH 值后, 稀释 10 倍再校正 pH 值, 用于实验中.

32. 间苯二酚(Resorcinol)-HCl 试剂　实验 38

制备两种母液:

a. 0.1 克间苯二酚及 0.25 克硫脲(thiourea)溶于 100 毫升冰醋酸, 贮于深棕色瓶中;

b. 5 份浓 HCl 用 1 份蒸馏水稀释.

应用试剂:

使用试剂前将 1 份 a 液加 7 份 b 液混合.

33. 钌红溶液　实验 18

加 5 滴 NH_4OH 制备 100 毫升弱碱性蒸馏水。在此水中加钌红 (Ruthenium red)至显浅桃红色为止。放深色瓶中可储存数日。最好现用现配。

34. Seliwanoff 试剂　实验 5

0.05 克间苯二酚溶于100毫升稀HCl中 ($HCl:H_2O=1:2$) 充分混匀。

35. 柠檬酸-磷酸盐缓冲液中的重碳酸钠(10^{-2}及 10^{-3}M) 实验 36

制备柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH 6.8)，见 9。

a. 10^{-2}M 重碳酸钠溶液：将0.420 克 $NaHCO_3$ 溶于柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH 6.8)，定容至 500 毫升。

b. 10^{-3}M 重碳酸钠溶液：将 0.042 克 $NaHCO_3$ 溶于柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH 6.8)，定容至 500 毫升。

36. NaCN 溶液(有毒！)　实验 11

制备 100 毫升 0.8 N NaOH 溶液 (3.2 克 NaOH 加蒸馏水至 100 毫升)。99 毫升此溶液加 1 克 NaCN 充分混匀。

37. 亚硫酸钠溶液　实验 11

制备 100 毫升 0.5 N NaOH 溶液 (2 克 NaOH 加水至 100 毫升)，取此溶液 85 毫升加 15 克 Na_2SO_3，充分混匀。

38. Somogyi 试剂　实验 49

制备两种母液：

a. 24 克无水 Na_2CO_3，16 克 $NaHCO_3$，12 克酒石酸钾钠及 140 克无水 Na_2SO_4，溶于 800 毫升蒸馏水，溶解时注意一个药剂完全溶解后再加另一个；

b. 4 克 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 及 40 克无水 Na_2SO_4 溶于 200 毫升蒸馏水。

应用试剂(配制后立即应用)：

取 4 份 a 液加 1 份 b 液，充分混匀.

39. 大豆(组织培养用) 实验 51,52

用做细胞分裂素的生物测定材料的大豆以 Acme 品种的敏感性和专一性最好，下列品种也能应用：Agate, Flambeau, Norchiet, Grant, Blackhawk, Chippewa, Dinfield, Shelby, Clark, Peking, Dorman, Hood, Lee, Jackson, Biloxi.

40. 0.5%淀粉溶液 实验 7

5 克可溶殿粉悬浮于 50 毫升蒸馏水中，混合后将其倒入 950 毫升蒸馏水中，强力搅拌，照实验所示使用.

41. 苏丹Ⅲ溶液 实验 18

0.1 克苏丹Ⅲ(Sudan Ⅲ)溶于 50 毫升 95%乙醇中，搅拌着加入 50 毫升甘油.

42. Tris 缓冲液(0.1 M, pH 7.6) 实验 8

溶解 12.1 克 THAM〔三(羟甲基)氨基甲烷〕于 980毫升蒸馏水，用 HCl 调其 pH 至 7.6，定容至 1 升. 如果不要一升可按比例少配.

补充读物

Bonner, J. and J. E. Varner (Eds.) 1965. Plant Biochemistry. Academic Press, New York and London.

Cohn, N. S. 1969. Elements of Cytology, 2nd ed. Harcourt, Brace and World, Inc., New York.

Cutter, E. G. 1969. Plant Anatomy: Experiment and Interpretation. Part I. Cells and Tissues. Addison-Wesley Publ. Co., Reading, Massachusetts.

Devlin, R. M. 1969. Plant Physiology, 2nd ed. Van Nostrand Reinhold Company, New York.

Doyle, W. T. 1970. The Biology of Higher Cryptogams. The Macmillan Co., New York.

Embree, H. D. and H. J. DeBey. 1968. Introduction to the Chemistry of Life. Addison-Wesley Publ. Co., Reading, Massachusetts.

Esau, K. 1965. Vascular Differentiation in Plants. Holt, Reinhart and Winston, Inc., New York.

Geissman, T. A. and D. H. G. Crout. 1969. Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism. Freeman, Cooper and Co., San Francisco, California.

Heath, O. V. S. 1969. The Physiological Aspects of Photosynthesis. Stanford University Press, Stanford, California.

Hillman, W. S. (Ed.). 1970. Papers in Plant Physiology. Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York.

Ikan, R. 1969. Natural Products: A Laboratory Guide. Academic Press, New York.

Klein, R. M. and D. T. Klein. 1970. Research Methods in Plant Science. The American Museum of Natural History, The Natural History Press.

Kozlowski, T. T. 1964. Water Metabolism in Plants. Harper & Row, Publ. Co., Inc., New York.

Kozlowski, T. T. (Ed.). 1968. Water Deficits and Plant Growth. 2 Vol. Academic Press, New York.

Laetsch, W. M. and R. E. Cleland (Eds.). 1967. Papers on Plant Growth and Development. Little, Brown and Co., Boston, Massachusetts.

Levitt, J. 1969. Introduction to Plant Physiology. The C. V. Mosby Co., Saint Louis, Missouri.

Loewy, A. G. and P. Siekevitz. 1969. Cell Structure and Function. Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York.

Machlis, L. (Ed.). Yearly. Annual Review of Plant Physiology. Annual Reviews Inc., Palo Alto, California.

Prescott, G. W. 1961. The Algae: A Review. Houghton, Mifflin Co., Boston, Massachusetts.

Price, C. A. 1970. Molecular Approaches to Plant Physiology. McGraw-Hill Book Co., New York.

Rabinowitch, E. and Govindjee. 1969. Photosynthesis. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Robinson, T. 1967. The Organic Constituents of Higher Plants, 2nd ed. Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minnesota.

Salisbury, F. B. and C. Ross. 1969. Plant Physiology. Wadsworth Publ. Co., Inc., Belmont, California.

Stafford, G. S. 1963. Plant Metabolism, 2nd ed. Heineman Educational Books, Ltd. London, England.

Stafford, G. A. 1965. Essentials of Plant Physiology. Heineman

Educational Books Ltd., New York.

Steward, F. C. 1968. Growth and Organization in Plants. Addison-Wesley Publ. Co., Reading, Massachusetts.

Torrey, J. G. 1967. Development in Flowering Plants. The Macmillan Co., New York.

Wightman, F. and G. Setterfield (Eds.) 1968. Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances. The Runge Press, Ltd., Ottawa, Canada.

Wilkins, M. B. (Ed.). 1969. The Physiology of Plant Growth and Development. McGraw-Hill, New York.

注 意

請勿在书上批改圈点，折角。

植物所图

统一书号：13031·135
定　价：0.94 元

本社书号：252·1310